

2015

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA

ZAKLJUČNA NALOGA
ESTROGENSKA IN ANDROGENSKA AKTIVNOST
ONESNAŽEVAL V ŽIVILIH IN OKOLJU

MATIJA KRALJ

KRALJ

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA

Estrogenska in androgenska aktivnost onesnaževal v živilih in okolju

(Estrogenic and androgenic activity of contaminants in food and in the environment)

Ime in priimek: Matija Kralj

Študijski program: Biodiverziteta

Mentor: izr. prof. dr. Elena Bužan

Somentor: asist. Felicita Urzi

Koper, avgust 2015

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Ime in PRIIMEK: Matija KRALJ

Naslov zaključne naloge: Estrogenska in androgenska aktivnost onesnaževal v živilih in okolju

Kraj: Koper

Leto: 2015

Število listov:	75	Število slik:	4	Število preglednic:	14
Število prilog:	1	Število strani prilog:	2	Število referenc:	110

Mentor: izr. prof. dr. Elena Bužan

Somentor: asist. Felicita Urzi

Ključne besede: hormonski motilec, škodljiv učinek, reprodukcija, estrogen, androgen

Izvleček:

Hormonski motilci so snovi, katerih mnoge so v okolje prišle s pomočjo človeških dejavnosti na področju industrije, agrokulture, proizvodnje pijač, hrane, kozmetičnih in farmacevtskih produktov. Med hormonske motilce uvrščamo snovi iz različnih skupin kot so: naravni in sintetični steroidni hormoni, fitoestrogeni, poliaromatske spojine, fitofarmacevtska sredstva, organske kisikove spojine, površinsko aktivne snovi in aditivi. Leta 1993 so bile opravljene prve raziskave s katerimi so dokazali škodljive učinke na reproduktivni in razvojni sistem rib in ptic, ter snovi s posedujočimi učinki označili kot okoljski problem. Leta 1996 ameriška agencija za zaščito okolja objavi neželene vplive hormonskih motilcev, kasneje pa se izkaže da ne vplivajo samo na endokrini sistem rib in ptičev ampak tudi na endokrini sistem plazilcev in sesalcev med katerimi prevladuje človek.

V prihodnosti je potrebno posvetiti trud razvoju testov, ki so potrebni tako za identifikacijo kot za kvantifikacijo. Kot glavni cilj se je potrebno osredotočiti na raziskave kombiniranih vplivov hormonskih motilcev na okolje in zdravje.

KEY WORDS DOCUMENTATION

Name and SURNAME: Matija KRALJ

Title of the final project: Estrogenic and Androgenic Activity of Contaminants in Food and in the Environment

Place: Koper

Year: 2015

Number of pages: 75 Number of figures: 4 Number of tables: 14
Number of appendix: 1 Number of appendix pages: 2 Number of references: 110

Mentor: Assoc. Prof. Elena Bužan, PhD

Somentor: Assist. Felicita Urzi

Keywords: endocrine disruptor, deleterious effect reproduction, estrogen, androgen

Abstract:

Endocrine disruptors are substances, many of which have come into the environment through human activities in industry, agriculture, production of beverages, food, cosmetic and pharmaceutical products. Endocrine disrupting substances are classified into different categories such as: natural and synthetic steroid hormones, phytoestrogens, polyaromatic compounds, pesticides, organic oxygen compounds, surfactants and additives. In 1993 the first study was carried out to show adverse effects on reproductive and developmental systems of fish and birds, as well as possessing substances with effects qualified as environmental problem.

Numerous studies have been conducted in animal organisms with a view to examine hormonal disorders in different developmental stages of animals. In 1996 the US Environmental Protection Agency has published undesirable effects of endocrine disruptors, and later it turns out that not only affect the endocrine system of fish and birds but also endocrine system of reptiles and mammals, among which human is dominated.

In the future, it is necessary to devote efforts to develop tests that are required for both identification and quantification. The main objective is to focus the researches on combined effects of endocrine disruptors on health and environment.

ZAHVALA

Iskrena hvala mentorju izr. prof. dr. Eleni Bužan za mentorstvu in nesebično predajanje znanja skozi vsa leta študija.

Iskrena hvala asist. Feliciti Urzi za pomoč pri izdelavi zaključne naloge in za nesebično predajanje znanja skozi vsa leta študija.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
2	UPORABNI DEL.....	4
2.1	Endokrini sistem.....	4
2.2	Hormonski motilci.....	5
2.2.1	Definicija hormonskih motilcev	5
2.2.2	Viri hormonskih motilcev	5
2.2.3	Delovanje hormonskih motilcev	7
2.2.4	Hormonski motilci estrogenskega in androgenskega hormonskega sistema	8
2.2.5	Sinergistična modulacija estrogenske in androgenske aktivnosti zmesi onesnaževal.....	11
2.3	Vrednotenje hormonskih motilcev v živilih in okolju	11
2.3.1	Kriteriji za identifikacijo hormonskih motilcev	11
2.3.2	Razpoložljivost in primernost preskusnih metod za identifikacijo in karakterizacijo učinkov hormonskih motilcev.....	13
2.3.3	Biotesti <i>in vivo</i>	14
2.3.4	Biotesti <i>in vitro</i>	16
2.4	Metode za kvantifikacijo hormonskih motilcev.....	17
2.4.1	Vzorčenje in shranjevanje vzorcev	19
2.4.2	Kromatografske metode	19
2.4.3	Plinska kromatografija	19
2.4.4	Tekočinska kromatografija.....	20
2.4.5	Visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLCM)	20
2.4.6	Masna spektrometrija	20
2.4.7	Imunološke metode	21
2.5	Aditivi v živilih.....	22
2.5.1	Propil galat (E 310)	22
2.5.2	Dibutil ftalat (DBP)	25
2.5.3	Metilparaben (E 218)	28
2.5.4	Butiliran hidroksianizol (BHA, E 320)	31
2.6	Onesnaževala v okolju.....	33
2.6.1	Poliklorirane spojine	33
2.6.2	Naravni in sintetični steroidni hormoni.....	37

2.6.3	Fitoestrogeni.....	37
2.6.4	Fitofarmacevtska sredstva (FFS).....	37
2.6.5	Organske kisikove spojine	40
2.6.6	Površinsko aktivne snovi (Surfaktanti)	43
2.7	Učinki njihove uporabe na človeka in okolje	46
3	ZAKLJUČEK	47
4	LITERATURA	49

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Dostopni <i>in vivo</i> testi za identifikacijo hormonskih motilcev s strani OECD (ang. Organisation for economic Co - operation and development).	15
Preglednica 2: Tehnične lastnosti Propil galata.	22
Preglednica 3: Maksimalne dovoljene vrednosti propil galata v nekaterih živilih.	24
Preglednica 4: Tehnične lastnosti Dibutil ftalata.	25
Preglednica 5: Prikaz vrednosti LC ₅₀ in LD ₅₀ , ter poti vstopa za izpostavljene organizme, ter uporabljene koncentracije DBP.	27
Preglednica 6: Tehnične lastnosti Metilparabena.	28
Preglednica 7: Uporaba Metil parabena v kozmetičnih izdelkih za leto 1981 in 2006, ter koncentracije E 218 v izdelkih za leto 1981 in 2003.	30
Preglednica 8: Uporabljene in maksimalne dovoljene količine Metil parabena v živilih ..	30
Preglednica 9: Tehnične lastnosti E 320.	31
Preglednica 10: Maksimalne dovoljene količine uporabe BHA v živilih v skladu z Direktivo Sveta No 95/2/EC.	32
Preglednica 11: Prikaz nekaterih polikloriranih spojin, tip testa na določenem organizmu ter učinki na izpostavljen organizem	34
Preglednica 12: Prikaz nekaterih pesticidov, tip testa na določenem organizmu ter učinki na izpostavljen organizem.	38
Preglednica 13: Prikaz nekaterih pesticidov, tip testa na določenem organizmu ter učinki na izpostavljen organizem.	41
Preglednica 14: Prikaz nekaterih surfaktantov, tip testa na določenem organizmu ter učinki na izpostavljen organizem.	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturna formula Propil galata.....	23
Slika 2: Strukturna formula Dibutil ftalata.....	26
Slika 3: Strukturna formula Metil parabena.....	29
Slika 4: Strukturni formuli BHA izomerov; 2-tert-butil-4-hidroksianizol (levo) in 3-tert-butil-4-hidroksianizol (desno).	32

KAZALO PRILOG

Priloga A : Tabela z oznakami in njihovimi razlagami za preglednice v poglavju
Onesnaževala v okolju.

SEZNAM KRATIC

ApnEO – alkilfenol etoksilati
BBP – butil benzil ftalat
BHA, E 320 – butiliran hidroksianizol
DBP – dibutil ftalat
DDE - diklorodifenildikloroetilen
DDT – dikloro–difenil–trikloroetan
DEHP – Bis(2-etilheksil) ftalat
DES – dietilbestrol
DINP – diisononil ftalat
E 218 - metilparaben
E 310 – propil galat
E1 – estron
E2 - 17 β -estradiol
E3 – estriol
EAS – endokrino aktivna snov
EE2 – etinilestradiol
EEQ – estrogensko enakovredne enote
ELISA – encimska imunoabsorpcijska preiskava
ER – estrogenski receptor
ES – endokrini sistem
FFS – fitofarmacevtska sredstva
FSH – folikel stimulirajoči hormon
GC – plinska kromatografija
HM – hormonski motilec
HPLC – visokotlačna tekočinska kromatografija
LC – tekočinska kromatografija
LH – luteinizirajoči hormon
MeEE2 – mestranol
MS – masna spektrometrija

OECD – Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj

PAH – policiklični aromatski ogljikovodiki

PCB – poliklorirani bifenili

PET – plastična steklenica

PVC – polivinil klorid

RIA – ang. radioimmunoassay

SPE – ekstrakcija na trdni fazi

TBBP-A – tetrabromobisfenol A

TBHQ – terciarni butilhidrokinon

WHO – svetovna zdravstvena organizacija

1 UVOD

Z razvojem socialne ekonomije, urbanizacije, velikega porasta števila prebivalcev in modernizacije se je posledično povečal tudi vnos škodljivih onesnažil v okolje. Te snovi so lahko bodisi kemičnega in/ali biološkega izvora.

Okoljska onesnaževala v določenih koncentracijah oziroma določeni jakosti povzročijo posledice, ki so za organizem neposredno ali posredno škodljive preko prehranjevalne verige. Izpostavljenost organizmov okoljskim onesnaževalom, lahko povzroča motnje v delovanju njihovega notranjega okolja ali pa so lahko za njih celo usodne. Veliko primerov videnih v preteklosti, nam je pokazalo kako lahko kemično onesnaženje vode, tal in zraka povzroči velike katastrofe in škodo na vseh ravneh biološke organizacije.

Zato je poznavanje, identifikacija in obvladovanje teh snovi, kot tudi preprečevanje pojavljanja v okolju, ključnega pomena za varovanje tako zdravja ljudi kot okolja v katerem živimo.

Kljub temu, da nam doba ekspanzivno znanstveno-tehnološkega napredka, omogoča odkrivati in preprečevati onesnaževanje okolja, pa ni moč prezreti pomanjkljivosti, ki se ob tem pojavljajo, dosti krat gre za finančni vidik, ker imamo primerno tehnologijo za preprečevanje onesnaževanja okolja, vendar pa zaradi drage nove tehnologije še vedno uporabljamo zastarelo, katera nam onemogoča, da bi v celoti lahko preprečili onesnaževanje okolja.

Kljub temu, da industrija stremi k temu, da poskuša zmanjšati vnos škodljivih snovi v okolje, predvsem z uporabo čistilnih naprav in filtrov, pa je zaradi konkurenčnosti trga po drugi strani prisiljena v povečano proizvodnjo izdelkov in uporabo cenejših surovin, aditivov in novih postopkov proizvodnje, za katere morda ne obvladuje vseh dejavnikov tveganja.

Mnoge od teh snovi, sproščenih v okolje skozi človeške dejavnosti, so sposobne motiti endokrini sistem ali hormone živali in ljudi, ki uravnavajo presnovo in delovanje telesa. Takšne endokrine aktivne snovi (EAS) se pojavljajo v različnih kategorijah kemikalij, vključno s sintetičnimi drogami, fitofarmaceutskimi sredstvi, snovmi, ki se uporabljajo v industriji in potrošniških izdelkih, industrijskih stranskih proizvodih in onesnaževalih, vključno z nekaterimi kovinami. Veliko število EAS naravnega izvora, ki jih lahko

vsebujejo nekatere užitne rastline, kakor tudi nekateri sekundarni presnovki gliv, ki lahko onesnažijo živila in krmo, izražajo-endokrino podobno dejavnost.

Študije, ki bi raziskovale učinke na človeški endokrini sistem so zelo omejene, za razliko od teh, pa nam študije opravljene na živalih omogočajo merjenje vseh indeksov hormonskega delovanja v različnih časovnih obdobjih razvoja in s tem lahko razložijo razmerje med izpostavljenostjo in vsemi učinki na endokrini sistem. Tako dobljeni podatki predstavljajo dovolj argumentov za interpretiranje kemično-inducirane endokrine motnje kot enega od dejavnikov v vzročni zvezi motenj reproduktivnega sistema in bolezni v človeški in populaciji prosto živečih živali (Diamanti-Kandarakis s sod. 2009).

V začetku 90. let prejšnjega stoletja so se prvič pojavile informacije o spojinah, ki negativno vplivajo na hormonski sistem pri živalih. Prva uradna poročila učinkov hormonskih motilcev v okolju na vodne organizme so bila objavljena leta 1980 ko so Howell s sod. (2014) v populaciji rib opazili nenormalne sekundarne spolne znake in jih povezali z onesnaženostjo okolja. Ena od prvih raziskav leta 1993, ko so Colborn in sod. (1993) dokazali učinke organoklorinih spojin na spremembe pri razvoju in razmnoževanju divjih populacij ptic in rib, ki so se pokazale kot spremembe pri razvoju in razmnoževanju le-teh. Leta 1996 je ameriška agencija za zaščito okolja objavila nezaželene zdravstvene vplive onesnaževal z estrogenskim delovanjem (Barlow 2001).

Kasneje se je izkazalo, da hormonski motilci ne vplivajo le na endokrini sistem (ES) rib in ptic pač pa tudi na ES plazilcev in sesalcev med katerimi največji odstotek populacije predstavlja človek.

Na področju klasifikacije in identifikacije hormonskih motilcev je bilo opravljenih veliko raziskav in že od leta 1995 so bile na to temo objavljene prve znanstvene publikacije. Večino teh snovi, ki delujejo tako da oponašajo delovanje naravnih estrogenov imenujemo ksenoestrogeni in vključujejo alkilfenole, poliklorirane spojine, pesticide, plastifikatorje in polibromirane difeniletre ("IEH" 1995). Poleg zgoraj navedenih spojin pa predstavljajo pomemben del hormonskih motilcev tudi naravni in sintetični hormoni z delovanjem na endokrini sistem ("IEH" 1995).

Uporaba nekaterih od teh kemikalij je sedaj prepovedana v mnogih državah (npr. alkilfenoli, nekateri mehčalci na osnovi ftalatov, fitofarmacevtska sredstva, PCB in DDT, in sintetični hormon dietilstilbestrol), druge pa so še vedno v široki uporabi. V zadnjem obdobju se vse več ugotavlja, da od teh kemikalij, ki so v široki uporabi, lahko veliko

število moti moške in ženske reprodukcijske funkcije in učinki nekaterih od teh hormonskih motilcev so vidni že pri zelo nizkih koncentracijah (ng/l).

Informacije o endokrinem delovanju kemikalij je mogoče pridobiti iz obstoječih podatkov, analiznih orodij ter »in vitro« in »in vivo« preskusnih metodah (1, 2 in 3 kategorije)¹, ali z drugimi mehanicističnimi preiskavami. Ugotavljanje neželenih učinkov je predpogoj za to, da endokrino aktivno snov uvrstimo med hormonske motilce. Načeloma noben posamičen test ne more zagotoviti vseh potrebnih informacij, na osnovi katerih bi se odločilo, ali je snov hormonski motilec. Za to se lahko poleg preskusnih »in vivo« metod s katerimi ocenimo rezultate izpostavljenosti organizma, uporablja podatke iz obstoječih informacij in drugih »in vivo« testih eko-toksičnosti, ki zagotavljajo informacije o rezultatih izpostavljenosti (EFSA 2013).

Čeprav Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD), daje na voljo dostop do virov podatkov, OECD smernice za preskušanje in standardizirane preskusne metode ter razvija nove preskusne metode in predlaga ocenjevanje kemikalij, ki bi lahko predstavljale potencialne hormonske motilce, je trenutno veliko vrzeli v razpoložljivih preskusnih metodah za identifikacijo endokrinih motilcev in ustreznost obstoječih preskusnih metod za ocenjevanje učinkov, ki jih povzročajo te snovi na zdravje ljudi in okolje (EFSA 2013). Pomanjkljivosti so vidne predvsem na področju razpoložljivih preskusnih metod, saj trenutno še niso razviti regulativni testi za mnoge taksone prostoživečih živali in ravno tako ni na voljo testov za sesalce. Večina ne zajema dovolj dobro endokrinih parametrov za odkrivanje učinkov endokrinih motilcev in kar je morda najpomembnejše, obdobja izpostavljenosti ne pokrivajo kritičnega razvojnega okna povečane dovzetnosti za motnje hormonskega sistema ter zapoznelih učinkov, ki se lahko kažejo v starejši dobi (EFSA 2013).

¹ Kategorija 1 - dokazi o hormonskih motilcih v vsajeni vrsti živalih; Kategorija 2 - vsaj nekateri in vitro dokazi o biološki aktivnosti, povezanih s hormonskimi motnjami; Kategorija 3 - ni dokazov o hormonski motilcih ali podatkov ni na voljo.

2 UPORABNI DEL

2.1 Endokrini sistem

Osnovne značilnosti endokrinega sistema predstavlja serija žlez z notranjim izločanjem (endokrinih žlez), ki izločajo hormone neposredno v kri ali določeno tkivo in tako urejajo različne telesne funkcije. Tradicionalni koncept endokrinih žlez vključuje hipofizo, česariko, ščitnico, priželjc, nadledvične žleze, spolne žleze in nekatere dele trebušne slinavke. Poleg teh specializiranih endokrinih žlez, imajo mnogi drugi organi, kot so srce, maščobno tkivo, mišice, jetra, črevesje in ledvice, sekundarne endokrine funkcije in tudi izločajo hormone (Bhagavan in Ha 2015).

Primarna funkcija endokrinega sistema je sintetiziranje hormonov v teh žlezah, katere proizvajajo in izločajo hormone v natančno določenih količinah in omogočajo kasnejši prenos le-teh do tarčne celice ali organa po krvnem obtoku. Hormoni se po krvi prenašajo bodisi prosto ali pa s pomočjo specifičnih prenašalnih proteinov. Hormoni se v tarčnih organih vežejo na specifične proteinske receptorje, ki se nahajajo na površini ali znotraj tarčnih organov. Hormoni se na receptorje vežejo po principu »ključ-ključavnica«, kar jim omogoča specifično vezavo za par hormon – receptor (Jason 2002).

Hormoni so pomembni za vse organizme in so bistvenega pomena za uravnavanje številnih procesov v telesu, od zgodnjih procesov, kot so celična diferenciacija med embrionalnim razvojem in oblikovanjem organov, kakor za uravnavanje delovanja tkiv in organov v odrasli dobi. Npr. reproduktivni hormoni, steroidi (estrogeni, androgeni, progesteroni) in proteini (LH in FSH) nadzorujejo kompleksne fiziološke procese, povezane z reprodukcijo. Ščitnični hormoni nadzorujejo presnovne procese in jih usklajujejo z ostalimi hormoni, ki sodelujejo pri apetitu in regulaciji presnove in telesne teže. Hormoni nadledvične žleze nadzorujejo različne fiziološke odzive na stres (Melmed s sod. 2011).

Poleg tega, da hormoni nadzorujejo večje fiziološke funkcije, tudi usklajujejo te funkcije med sistemi in tako urejajo ravnotežje hormonov (homeostazo) v telesu. Zato, da ne pride do nepravilnosti delovanja endokrinega sistema, hormoni nadzorujejo tudi svoje izločanje z negativno povratno zanko. Kljub kompleksnosti tega sistema pa je le-ta zelo občutljiv na

zunanje vplive, kot npr. prisotnost eksogenih kemikalij, ki lahko motijo njegovo delovanje in pri mlajših osebkih lahko celo povzročijo motnje v razvoju organizma (Jason 2002).

2.2 Hormonski motilci

2.2.1 Definicija hormonskih motilcev

V literaturi so hormonski motilci definirani:

»Hormonski motilec je eksogena snov ali zmes, ki spremeni funkcijo endokrinega sistema in zato povzroča škodljive učinke na zdravje tarčnega organizma, ali njegovih potomcev, ali (sub) populacije. Potencialni hormonski motilec je eksogena snov ali zmes, katera poseduje lastnosti, katerih pričakovani učinki lahko vodijo do hormonske motnje v tarčnem organizmu, ali njegovih potomcev, ali (sub) populacije.« (Damstra s sod. 2002)

»Hormonski motilec je eksogeni agent, kateri posega v sintezo, sekrecijo, transport, vezavo, akcijo ali ekskrecijo naravnih hormonov v telesu, katerega glavna naloga je uravnavanje homeostaze, reprodukcije, razvoja in/ali vedenja.« (Crisp s sod. 1998).

»Je katerakoli kemikalija, katere lastnost je da direktno ali indirektno vzajemno deluje z endokrinim sistemom in njene posledice se kažejo kot vpliv na hormonalni sistem, tarčne organe ali tkiva.« (S. Barlow s sod. 2010).

2.2.2 Viri hormonskih motilcev

Hormonski motilci so vseprisotni v okolju, v katerem največkrat povzročajo nezaželene učinke. Poznamo tako naravne kakor tudi sintetične, ki jih je ustvaril človek.

Naravni steroidni hormoni, ki jih proizvajajo tako ljudje kot živali in jih z izločanjem sproščajo v okolje. Med najznačilnejše predstavnike naravnih steroidnih hormonov uvrščamo progesteron, testosteron od katerih so najštevilčnejši predstavniki estrogeni hormone med katere spadajo: 17 β -estradiol (E2), estron (E1) in estriol (E3), ki se

sintetizirajo v endokrinih žlezah (ovarji in testisi), iz telesa pa se izločijo z urinom in fecesom v okolje (Lintelmann s sod. 2003)

Sintetični steroidni hormoni, so skupina farmacevtskih izdelkov s katerimi je možna preprečitev ovulacije ter uporaba za terapije v menopavzi. Primer sintetičnih hormonov pa sta etinilestradiol (EE2) in mestranol (MeEE2), ki sta sestavina kontracepcijskih sredstev (Ying s sod. 2002). Med dobro poznanimi pa je tudi dietilstilbestrol (DES), ki se je v preteklosti uporabljal za preprečevanje splavov in prezgodnjega rojstva (Bergman s sod. 2012).

Fitoestrogeni, so naravni proizvodi rastlin z estrogensko aktivnostjo, mednje štejemo tudi proizvode gliv z estrogenskim delovanjem **mikoestrogeni** (Lintelmann s sod. 2003).

Poliaromatske spojine, so industrijsko sintetizirane organske spojine iz skupine cikličnih ogljikovodikov. So med najbolj toksičnimi in nevarnimi spojinami, ki jih je ustvaril človek. Mednje spadajo: PCB (poliklorirani bifenili), ki so uporabljeni kot sredstva za termoizolacijo, mazivna sredstva (hidravlična olja, ...), aditivi za plastične mase, dodatki za impregnacijo, ... ; PAH (policiklični aromatski ogljikovodiki) nastajajo kot stranski produkt pri nepopolnem izgorevanju (Lintelmann s sod. 2003).

Fitofarmacevtska sredstva (FFS), so obsežna skupina biološko aktivnih snovi namenjena uničevanju škodljivcev na obdelovalnih površinah (DDT, insekticidi, herbicidi, ...) (Lintelmann s sod. 2003).

Organske kisikove spojine, mednje spadajo bisfenoli in ostale snovi, ki se dodajajo plastiki in dioksine prisotne v smolah, plastiki in belilih (Lintelmann s sod. 2003).

Površinsko aktivne snovi, to so skupina kemikalij, ki se pretežno uporablja v proizvodnji detergentov npr. alkilfenol etoksilati (APnEO), predvsem nonilfenolne in oktilfenolne spojine (Lintelmann s sod. 2003).

Aditivi, so kemične snovi, katere dodajamo živilom z namenom konzerviranja, zgoščevanja, ojačevanja okusa, izboljšane arome in izgleda. V današnji industriji hrane in pijač so nepogrešljivi. Na vsaki embalaži so v seznamu sestavin navedeni z imenom ali s kratico, ki se začne s črko E in trimestnim številom. Seznam odobrenih aditivov, ki se lahko dodajajo živilom je opredeljen s Prilogo II (Uredba (ES) št. 1333/2008, z dne 16. decembra 2008, str. 16).

2.2.3 Delovanje hormonskih motilcev

Mehanizmi delovanja hormonskih motilcev so različni. Lahko se vežejo neposredno na hormonske receptorje ali pa na njih posredno vplivajo in tako spremenijo lastnosti/delovanja na različnih ravneh.

Nekateri od hormonskih motilcev oponašajo hormon tako, da se vežejo na njegov receptor in aktivirajo isti ali močnejši odziv kakor naravni hormon, ali lahko spodbujajo proizvodnjo več hormonskih receptorjev. Ta vrsta snovi povzroča agonistično delovanje tako, da ojači učinke endogenih hormonov (Jason 2002).

Po drugi strani pa je posledica antagonističnega delovanja zaviranje oz. zmanjšano delovanje receptorja s čimer je preprečeno delovanje naravnega hormona. Te spojine se vežejo na receptor in sprožijo šibkejši učinek kot naravno prisoten hormon ali nimajo nobenega biokemičnega učinka, vendar preprečujejo hormonsko delovanje preprosto tako, da zasedajo mesto ustreznega hormona na tem receptorju (Sumpter 2008). Vezava na receptor lahko poteka kot kompeticija, pri kateri naravni hormon in antagonist tekmujeta za isto vezavno mesto na receptorju, kar lahko vodi do popolne deaktivacije receptorja; lahko pa je vezava nekompetitivna, kjer se antagonist veže v bližino aktivnega mesta, na alosterično mesto receptorja, kar povzroči počasnejše delovanja receptorja.

Določeni hormonski motilci se vežejo na prenašalno beljakovino s čimer se zmanjša razpoložljivost teh proteinov za transport hormonov skozi krvni obtok. Drugi spreminjajo raven endogenih hormonov, tako da pospešujejo njihovo razgradnjo in odstranitev ali inaktivirajo encime, ki omogočajo njihovo razgradnjo; nekateri reagirajo neposredno s hormoni in spremenijo njihovo strukturo ali vplivajo na njihovo sintezo (Cook s sod. 1993; Kelce s sod. 1995).

V splošnem hormonski motilci vplivajo na delovanje hormonskega sistema in s tem na zdravje ljudi in prosto živečih živali. Njihov vpliv se lahko kaže na kateri koli hormonski sistem v organizmu; npr. hormonski sistem vpleten v razvoj osebkov, funkcije reproduktivnih organov, metabolne, kardio-vaskularne in vedenjske funkcije. Čeprav obstaja veliko hormonov in sistemov je večina dosedanjih študij hormonskih motilcev pretežno osredotočena na kemikalije, ki sodelujejo z estrogenskimi, androgenskimi in ščitničnimi hormonskimi sistemi. Novejše študije kažejo, da lahko okoljske kemikalije motijo tudi druge endokrine sisteme (Casals-Casas in Desvergne 2011).

2.2.4 Hormonski motilci estrogenskega in androgenskega hormonskega sistema

Razvoj in funkcija reproduktivnega sistema je odvisna od koncentracije in ravnovesja hormonov. Anomalije so lahko posledica modulacije koncentracij estrogenih, androgenih in ščitničnih hormonov.

Prvi dokazi potencialnih učinkov endokrinih motilcev prihaja iz posledic uporabe umetnih hormonov, kot npr. dietilstilbestrola (DES). Vidne posledice učinkov teh hormonskih motilcev je spodbudilo raziskovalce, da so v zadnjem desetletju opravili številne študije na prostoživečih živalih in raziskave na laboratorijskih živalih, ki so pokazale široko paleto učinkov endokrinih motilcev na reproduktivno zdravje. Rezultati teh raziskav so danes nujno izhodišče za obravnavo posledic motenj reproduktivnega sistema pri ljudeh (Voulvoulis in Scrimshaw 2003).

Zgodnja opozarjanja na neželene učinke kemikalij so se začele z izjavo multidisciplinarne skupine znanstvenikov leta 1991, v kateri so obravnavali dokaze o hormonskih motnjah povzročenih s strani kemikalij prisotnih v okolju. V svojem dokumentu so povzeli naslednje učinke hormonskih motilcev na zdravje reproduktivnega sistema prostoživečih živali: »zmanjšana plodnost ptic, rib, školjk in sesalcev; zmanjšano izleganje ptic, rib in želv; prirojene deformacije ptic, rib in želv; presnovne motnje ptic, rib in sesalcev; vedenjske motnje pri pticah; demaskulinizacija in feminizacija rib, ptic in sesalcev moškega spola; defeminizacija in maskulinizacija rib in ptic ženskega spola.« (Colborn, 1996).

Povzetek nekaterih raziskav o vplivu hormonskih motilcev na reproduktivni sistem prostoživečih živali (podgana, miš, aligator) (WHO 2012):

Dietilstilbestrol

- Moški reproduktivni sistem: zvišane vrednosti gonadotropina (Yamamoto s sod. 2003); epididimalne ciste, sterilnost in kriptohorizem (McLachlan 1977)
- Ženski reproduktivni sistem: zmanjšanje reproduktivne kapacitete (McLachlan 1977); povečanje teže maternice (Lewis s sod. 2003).

Tributikositer

- Moški reproduktivni sistem: povečanje anogenitalne razdalje (Adeeko s sod. 2003).

- Ženski reprodukativni sistem: zmanjšanje števila zarodnih celic v fetalnih jajčnikih (Kishta s sod. 2007).

Fitoestrogeni (Genistein, Daidzein)

- Moški reprodukativni sistem: znižanje koncentracije plazemskega testosterona (Pan s sod. 2008); povečanje mase testisov (Fisher s sod. 1999).
- Ženski reprodukativni sistem: histopatološke spremembe v jajčnikih in maternici, nereden menstrualni cikel (Nagao s sod. 2001); povečanje mase maternice (Lewis s sod. 2003).

Alkil fenol etoksilati (p-tert-oktilfenol, p-nonilfenol)

- Moški reprodukativni sistem: povečanje mase testisov, redukcija epitelijske višine eferentnih vodov (Fisher s sod. 1999).
- Ženski reprodukativni sistem: nereden menstrualni cikel (Katsuda s sod. 2000; Pocock s sod. 2002); trajajoč estrus (Katsuda s sod. 2000); zmanjšanje mase jajčnikov (Pocock s sod. 2002).

Ftalatni estri (DEHP, BBP, DINP, DBP)

- Moški reprodukativni sistem: zmanjšana plodnost (Wolf s sod. 1999); znižanje ravni serumskega testosterona (Andrade s sod. 2006).
- Ženski reprodukativni sistem: nepravilnosti maternice in zmanjšana plodnost (Wolf s sod. 1999).

Klorirani pesticidi (DDE)

- Moški reprodukativni sistem: zmanjšanje anogenitalne razdalje (Kelce s sod. 1995; You s sod. 1998); neobičajno majhen penis (Guillette s sod. 1994).
- Ženski reprodukativni sistem: zvišanje vrednosti plazemskega estradiola, nenormalna morfologija jajčnikov z velikim številom poliovularnih foliklov in policikličnih jajčnih celic (Guillette s sod. 1994).

Dioksini

- Moški reprodukativni sistem: zmanjšana dnevna produkcija sperme (Mably s sod. 1992).
- Ženski reprodukativni sistem: zmanjšana plodnost, reducirana masa maternice, vaginalna nit (Gray in Ostby 1995).
-

Poliklorirani bifenili (PCBji; PCB 77, 118, 126, 132, 169)

- Moški reprodukativni sistem: povečanje mase testisov, zmanjšana anogenitalna razdalja (Faqi s sod. 1998); povečanje anogenitalne razdalje (Kuriyama in Chahoud 2004).
- Ženski reprodukativni sistem: vaginalna nit (Wolf s sod. 1999); časovno zadržano odpiranje nožnice (Faqi s sod. 1998).

Dikarboksimidni fungicidi (Vinklozolin, Procimidon)

- Moški reprodukativni sistem: povečano število apoptotskih zarodnih celic v testisih (Cowin s sod. 2010); nenormalna morfologija semenskih tubulov (Elzeinova s sod. 2008; Gray s sod. 1994).

Herbicidi (Linuron)

- Moški reprodukativni sistem: zadržan razvoj bradavic, zmanjšanje teže testisov, reducirano število spermatid, zmanjšana anogenitalna razdalja (Wolf s sod. 1999).

Svinec

- Moški reprodukativni sistem: povečanje mase prostate (McGivern s sod. 1991); zmanjšanje mase testisov (Ronis s sod. 1996).
- Ženski reprodukativni sistem: motnje menstrualnega ciklusa (Ronis s sod. 1996); nepravilen vzorec sproščanja gonadotropinov, daljša in neredna obdobja diestrusa (McGivern s sod. 1991).

Kadmij

- Moški reprodukativni sistem: povečanje premera semenskih tubulov, delna ali celotna evakuacija semenskih tubulov (Toman s sod. 2002); zmanjšanje v količine izhodne sperme (Foote 1999).
- Ženski reprodukativni sistem: predhodni pojav odpiranja vaginalne odprtine (Johnson s sod. 2003); težnja k zapoznelemu odpiranju vaginalne odprtine (Ishitobi in Watanabe 2005).

Mangan

- Moški reprodukativni sistem: zvišanje vrednosti serumskega gonadotropina in zvišanje vrednosti serumskega testosterona (Lee s sod. 2006).
- Ženski reprodukativni sistem: zvišanje vrednosti serumskega estradiola in zvišanje vrednosti serumskega gonadotropina (Pine s sod. 2005).

2.2.5 Sinergistična modulacija estrogenske in androgenske aktivnosti zmesi onesnaževal

Sintetični hormonski motilci se razlikujejo v učinkovitosti in stopnji izpostavljenosti, ki je potrebna za povzročitev škodljivega učinka. Zakonodaja sicer predvideva regulacijo njihovega spuščanja v okolje na individualni ravni, tako da morajo biti koncentracije izpuščenih snovi v okolje v mejah, ki ne povzročajo tveganje za zdravje ljudi in okolja. Zaskrbljujoče pri tem pa je, da niso upoštevani učinki kronične izpostavljenosti nizkimi koncentracijam hormonskih motilcev (Colborn s sod. 1993). Poleg tega se te snovi v okolju ne pojavljajo posamično, ampak v različnih kombinacijah in lahko medsebojno delujejo sinergistično. V nekaterih eksperimentalnih sistemih, se je kombinacija celo dveh šibkih spojin izkazala za več kot 1000-krat učinkovitejša v primerjavi z učinkom posamezne spojine (Arnold s sod. 1996).

Kortenkamp (2007) se je v članku posvetil pregledu kombiniranih efektov kemikalij s hormonsko aktivnostjo, ki spadajo v isto skupino (npr. estrogeni, androgeni,...itd). Zelo malo je znanega o kombiniranih učinkih kemikalij, katere spadajo v različne skupine. V ta namen je podal predlog za razvrstitev kemikalij v razrede s primerljivimi lastnostmi in škodljivimi učinki na organizem. S kombinacijo različnih kemikalij uvrščenih v iste skupine, je z analizo dobljenih rezultatov ugotovil, da za sprožitev endokrine motnje v mešanici ne potrebujemo enakih količin potrebnih, da kemikalija samostojno izzove škodljiv učinek. Za sprožitev škodljivega učinka mešanice endokrino aktivnih kemikalij so potrebne manjše količine posamezne kemikalije, saj se endokrina motnja ene kemikalije lahko inducira s pomočjo prisotnosti ene ali več drugih kemikalij v mešanici.

2.3 Vrednotenje hormonskih motilcev v živilih in okolju

2.3.1 Kriteriji za identifikacijo hormonskih motilcev

Kriteriji za identifikacijo hormonskih motilcev morajo definirati znanstvena merila, ki jih je potrebno uporabiti, da lahko določeno snov identificiramo kot hormonski motilec in definirati škodljive učinke specifične za endokrini sistem ter podati razlike od endokrine modulacije (EFSA 2013).

Znanstvena merila, ki določajo hormonske motilce so (EFSA 2013):

- Prisotnost endokrine aktivnosti in škodljivega učinka v tarčnem organizmu ali njegovih subpopulacijah,
- relativni odziv v primerjavi s kontrolo/ in vzorcem brez prisotnosti hormonsko aktivnih snovi,
- verjetna ali dokazana vzročna zveza med endokrino aktivnostjo in škodljivim učinkom.

Škodljivi učinki specifični za endokrini sistem (EFSA 2013):

- na reprodukcijo,
- rast in
- razvoj.

Škodljive učinke je potrebno opazovati v »nedotaknjenih« prvotnih organizmih na katerih niso bili opravljeni nobeni posegi. Iz tega stališča je potrebno poudariti, da je pomembnost teh testov za netarčne populacije zelo velika. Posebno pozornost je potrebno pri tovrstnih testih kot tudi pri končnih rezultatih posvetiti posledicam, katere so ključnega pomena in imajo velik vpliv na razmnoževanje in stabilnost populacij. Endokrini sistem zagotavlja ohranjanje homeostaze preko mehanizmov povratnih informacij, ki se sprožijo v primeru različnih endokrinih modulacij ali motenj. V primeru da je endokrina modulacija povzročena s strani škodljive snovi začasna ali v mejah pri katerih so homeostatski mehanizmi še sposobni/zmožni uravnavanja, učinek imenujemo »*endokrina modulacija*«. V nasprotnem primeru ko mehanizmi, induciranih sprememb niso sposobni uravnati je potrebno slednje obravnavati kot škodljive učinke na hormonski sistem. Kratkotrajne oz. začasne modulacije na katere se običajno odrasel organizem lahko prilagodi, pa lahko povzročijo trajne spremembe v razvoju ali še ne razvitih homeostatskih mehanizmi mlajših osebkov (WHO 2012).

Homeostatski mehanizmi uravnavajo delovanje organizma in s tem zagotavljajo homeostazo, vendar je za večino toksikoloških procesov znano, da obstaja meja pod katero velja, da ne bo induciranja pomembnega biološkega procesa (Dybing s sod. 2002). Zato

velja, da za določitev mejne vrednosti, ki predstavlja količino kemikalije potrebne za sprožitev škodljivega učinka ne moremo uporabiti eksperimentalnih pristopov. Omenjeni pristopi s pomočjo katerih analiziramo učinke kemikalij/snovi posedujejo detekcijske omejitve, ki posledično rezultirajo v nejasnih mejnih vrednostih če le te obstajajo (Kortenkamp s sod. 2011). Škodljiva snov mora kljub prisotnosti homeostatskih mehanizmov doseči in preseči mejne vrednosti, katere ji omogočijo sprožitev škodljivih učinkov v tarčnem organizmu. Na podlagi omenjenih pogojev kateri morajo biti izpolnjeni, lahko kemikalijo ovrednotimo kot hormonski motilec (Dybing s sod. 2002).

2.3.2 Razpoložljivost in primernost preskusnih metod za identifikacijo in karakterizacijo učinkov hormonskih motilcev

Leta 1998 je OECD (ang. Organisation for Economic Co-operation and Development) pričela z izvajanjem programa namenjenega reviziji obstoječih in razvoju novih metod za identifikacijo in karakterizacijo hormonskih motilcev (OECD 2012). Ustvarili so shematske sezname standardiziranih metod, ter jim dodali pripadajoča navodila katera je potrebno upoštevati pri izvedbi preskusov. Navodila prav tako vsebujejo predloge s pomočjo katerih lahko ovrednotimo hormonsko motnjo preiskovane kemikalije (EFSA 2013).

Nadzorni odbor OECD določa in potrjuje preskusne metode, ter podaja smernice za njihov nadaljnji razvoj in izboljšave. Vse standardizirane metode so s podpisom dokumenta o soglasju sprejete s strani držav članic OECD (EFSA 2013).

Ker je na voljo zelo širok spekter testnih metod s katerimi je mogoče indeficirati in karakterizirati HM (Keith s sod. 2000), je pomembna izbira primerne metode kakor tudi njeno vrednotenje po opravljenih analizah. V ta namen si moramo postaviti jasne cilje, kateri vključujejo pet pomembnih vprašanj (EFSA 2013):

- Kakšen je naš namen analiz, ki jih bomo uporabili,
- kaj želimo determinirati,
- ali je metoda/model veljaven,
- ali so vse informacije združene in ali je bila izvedba testov pravilna (npr.: Ali je prišlo do kakšnih nepravilnosti pri izvedbi metode?),

- je bila izbrana metoda pravilna.

2.3.3 Biotesti *in vivo*

So testi pri katerih je tretiran celoten živalski osebek. To je lahko test pri katerem je tretiran individualen osebek ali test v katerega so vključene prostoživeče populacije živali (WHO 2012).

Biotesti *in vivo* so ključnega pomena, saj je v testiranje vključen celoten organizem. Predlagano je, da se za popolno razumevanje, multigeneracijske reprodukcijske študije slednji izvajajo skupaj z drugimi toksikološkimi testi. S pomočjo teh testov lahko dokažemo in napovemo škodljive učinke na primeru živih organizmov (O'Connor s sod. 1998).

Dva najbolj široko uporabljena testa za identifikacijo oestrogenov sta maternični test v glodalcih (OECD TG 440) in vaginalni test v samicah glodalcev (Dorfman in Dorfman 1954). Učinke hormonskih motilcev pri materničnem testu v glodalcih (OECD TG 440) ovrednotimo s spremembo mase maternice pri nezrelih ali ovariectomiziranih samicah glodalcev (odziv organa, da zmanjša učinek endogenih substanc). Test poteka 3-4 dni. Maternični test v samicah glodalcev (OECD TG 440) s pomočjo katerega detektiramo spremembe v histologiji in vaginalnem epiteliju, ki se pojavijo ob prisotnosti hormonskih motilcev (Martin in Claringbold 1960).

Med kratkoročne teste za identifikacijo hormonskih motilcev se uvršča tudi test, namenjen preiskovanju reproduktivnih učinkov HM v samicah glodalcev in se imenuje Hershbergerjev test (Hershberger s sod. 1953). Z njegovo pomočjo detektiramo sposobnost HM, da sproži agonistični ali antagonistični učinek na androgenem receptorji in se izvaja v kastriranih podganah, kjer dobimo rezultate na podlagi meritev, ki se kažejo v povečanju teže ventralne prostate in seminalnih veziklov.

OECD TG 234 je akutna metoda, ki temelji na določanju vitelogenina v krvi mladih rib in samcev vrste *Danio rerio*. Izpostavljenost odraslih zebrič (EE2) pri količini 5ng/l izzove

vitelogenezo v izpostavljenih samcih (Petersen s sod. 2000). VTG je velik fosfolipoprotein z vsebnostjo kalcija katerega lastnosti so pri slednjem testu uporabljene za posredno kvantifikacijo proteina v plazmi rib. Zaradi zelo nizkih vrednosti, ki so potrebne da se izzove vitelogeneza je potrebno za doseg nizke meje detekcije uporabiti bolj občutljivejše metode kot so RIA in ELISA (Andersen 2000).

Preglednica 1: Dostopni *in vivo* testi za identifikacijo hormonskih motilcev s strani OECD (ang. Organisation for economic Co - operation and development) (Committee in Testing 2012).

Identifikacijska številka metode (TG)	Poimenovanje metode	Leto sprejetja metode
440	Maternični biotest v glodalcih: Akutni pregledni preskus oestrogenskih lastnosti	2007
407	28-dnevna oralna študija toksičnosti v glodalcih	2008
211	Preskus razmnoževanja vrste <i>Daphnia Magna</i>	2008
441	Hershbergerjev biotest v podganah: Akutni pregledni preskus (anti) androgenih lastnosti	2009
229	Akutni preskus razmnoževanja rib	2009
230	21-dnevni preskus na ribah: Akutni preskus za pregled oestrogenskih in androgenskih aktivnosti in inhibicije aromataze	2009
231	Preskus metamorfoze dvoživk	2009
234	Preskus spolnega razvoja rib	2011

2.3.4 Biotesti in vitro

Ena glavnih prednosti *in vitro* testov je, da so dobljeni rezultati v večini primerov zelo natančni in dobro definirani. Navkljub dobrim karakterizacijskim in identifikacijskim lastnostim *in vivo* testov pa je potrebno poleg njih izvesti tudi *in vitro* teste, saj morajo biti izvedeni obe metodi, preden preiskovano snov lahko razglasimo kot hormonski motilec (Beresford s sod. 2000).

»Biotesti *in vitro* so testi pri katerih ni uporabljen celoten organizem. Sistemi kateri so uporabljeni lahko vključujejo celične linije ali subcelične preparate, kateri so pridobljeni iz netretiranih organizmov.« (WHO 2012). So metode katere izvajamo v laboratoriju in na katere imajo vpliv samo laboratorijski pogoji. Med *in vitro* metode uvrščamo teste, ki vključujejo pomnoževanje celic, kompetitivno vezavo ligandov in testi kateri temeljijo na ekspresiji genov.

Testi s kompetitivno vezavo ligandov temeljijo na primarnem načinu delovanja estrogenov in ksenoestrogenov katerih primarna lastnost je, da se vežejo na estrogenski receptor (ER). Na ER so vezani radioaktivno označeni estrogeni s katerimi tisti v vzorcu tekmujejo za vezavna mesta. Po primerjavi vzorcev s kontrolo, ki največkrat vsebuje 17 β -estradiol lahko kvantificiramo prisotne estrogene v vzorcu. Slabost, ki jo poseduje omenjeni test in je v primeru hormonskih motilcev zelo pomembna je, da ne razlikuje med agonističnim in antagonističnim vplivom spojin ki jih analiziramo (de Mes 2007; Shelby s sod. 1996).

Testi pomnoževanja celic oz. »E-screen«, tovrstne metode temeljijo na predpostavki, da pride do pomnoževanja človeških celičnih linij, ko so le-te izpostavljene hormonskemu motilcu z estrogensko aktivnostjo. Največkrat uporabljene celične linije za določanje estrogenskih aktivnosti so MCF-7 ali T47-D. Obe celični liniji sta pridobljeni iz rakavih celic pri človeku (Soto s sod. 1995; Zacharewski 1997).

Test ER-Calux, metoda vključuje gensko spremenjene celice raka dojke (T47D) v katerih jedro je vključena rekombinantna DNA. Ob prisotnosti estrogenov pride do aktivacije

receptorja in posledično vezave kompleksa ligand-receptor na promotorsko regijo, ki se nahaja na stabilno integriranem luziferaznem genu. Protein luciferaza se nato inducira in je lahko enostavno merjen s pomočjo lize celice. Po dodatku substrata luciferin poteče reakcija z luciferazo, katere reakcijo zaznamo kot spremembo intenzitete svetlobe, ki jo izmerimo s pomočjo spektrofotometra (Legler 2002). Drugi pogosto uporabljen test, ki vključuje gensko spremenjene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, je YES test.

YES test (ang. Yeast estrogen screen) je test katerega namen je identifikacija spojin oz. snovi, katere lahko reagirajo z humanim estrogenskim receptorjem (hER). Razvili so ga na Oddelku za genetiko v Glaxo (UK) pod vodstvom profesorja John P. Sumpterja in sicer leta 1996. Zasnova testa je temeljila na dejstvu, da normalne celice kvasovk ne vsebujejo nobenih estrogenskih receptorjev, zato so DNA sekvenco hER vstavili v primarni kromosom kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* BJ 1991. Poleg zgoraj omenjenega humanega endokrinega receptorja pa celice vsebujejo tudi ekspresijski plazmid, ki nosi zapis za reporterski gen *lacZ*, kateri kodira encim β -galaktozidazo, ki je pomemben pri razgradnji disaharida laktoze na glukozo in galaktozo (še te dva monosaharida se lahko absorbirata). Primarna uporaba encima β -galaktozidaza, pa je merjenje receptorske aktivnosti. V sistemu je hER izražen v obliki, ki dopušča da se le-ta veže na estrogen-odzivni element (ang. estrogen-responsive sequences; ERE). Te se nahajajo znotraj sekvence močnega promotorja, lociranega na ekspresijskem plazmidu. Po vezavi aktivnega liganda, ERE reagira z transkripcijskim faktorjem in drugimi transkripcijskimi komponentami, da se lahko modulira transkripcija gena (Katzenellenbogen in sod., 1993). To povzroči ekspresijo reporterskega gena *lac-Z* in proizvedeni encim (β -galaktozidaza) se sprosti na medij, kjer pride do pretvorbe kromogenega substrata chlorphenol red- β -D-galactopyranosidase (CPRG) iz običajne rumene v rdečo bravo, kateri lahko izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 540 nm (Routledge in Sumpter 1996).

2.4 Metode za kvantifikacijo hormonskih motilcev

Analize za identifikacijo hormonskih motilcev predstavljajo “analitičen izziv”, saj morajo biti zaradi veliko različnih spojin in zelo majhne vsebnosti v okoljskih vzorcih ter zelo

nizke detekcijske vrednosti potrebne za identifikacijo (manj kot 1 ng/l vzorca), analitične metode visoko občutljive in morajo imeti dobro detekcijsko sposobnost (Alda in Barceló 2001).

V današnjem času so se potrebe po testih s tovrstnimi lastnostmi zelo povečale in tovrstna potreba se bo samo stopnjevala. Po odvzemu vzorca oz. snovi bodisi živila ali npr. vzorca vode je potrebno sam vzorec prvotno skoncentrirati z uporabo izbrane fizikalne metode in šele nato sledi izbira primerne kemijske metode s pomočjo katere identificiramo in kvantificiramo spojine in/ali zmesi, katerih lastnosti jim omogočajo estrogensko ali androgensko aktivnost.

Velik izziv pa predstavljajo testi z vidika samih snovi, katerih analize opravljamo, saj nekatere snovi medsebojno reagirajo in tako lahko popolnoma spremenijo lastnosti zmesi. V takemu primeru je ključnega pomena, da analizo opravljamo na celokupnem vzorcu, saj bomo ravno s takim pristopom dosegli želeni rezultat. Tovrstni testi nam kasneje pripomorejo k upravljanju in postavljanju priporočenih odmerkov posamezne snovi, kateremu je lahko organizem izpostavljen oz. količino, ki je še sprejemljiva da jo dodamo živilu in ki je zaradi tako namernih in nenamernih izpustov prisotna v okolju.

Ker so hormonska onesnaževala vseprisotna v okolju, tako v celinskih, pitnih in odpadnih vodah, zraku in tleh v količinah ng/L ali µg/L je pri takih vzorcih potrebno predhodno koncentriranje. V večini primerov si pri tem postopku pomagamo z ekstrakcijo na trdni fazi (ang. solid phase extraction; SPE) (De Mes s sod. 2005).

V prvi fazi ko izbiramo metodo najprej uporabimo ustrezno fizikalno metodo, kasneje pa v drugi fazi z ustrezno kemijsko analizo identificiramo in kvantificiramo estrogensko aktivno spojino. Ni pomembno samo poznavanje spojin, ki jih vsebuje odpadna, pitna voda, zrak, zemlja, hrana saj nam le-te informacije ne podajo odgovora o škodljivih učinkih na organizme zaradi nepoznavanja dostopnosti teh spojin (Wharfe 2004).

Najpogostejše uporabljene metode za kvantifikacijo hormonskih motilcev (izbira analize odvisna od ciljnih spojin) so GC/MS, HPLC/MS, LC/UV in GC/tandemska masna

spektrometrija. Seveda pa se ne moremo izogniti dejstvu, da vsaka od naštetih analiz zahteva določeno količino začetnega kapitala in čas za osebni trening, ki je ključnega pomena da analize opravimo učinkovito in hitro. Kasneje nam to prinese prepotrebne izkušnje in odlične kvantitativne informacije (Chang s sod. 2009).

2.4.1 Vzorčenje in shranjevanje vzorcev

Postopek kvantifikacije motilcev se začne z odvzemom vzorca in izbrano metodo za shranjevanje ter transport vzorcev do laboratorija. Večina vzorcev shranjuje v kozarčke iz rjave steklovine brez predhodne ekstrakcije medtem, ko se nekateri poslužujejo ekstrakcije na trdni fazi že na mestu odvzema vzorca ter si s tem prihranijo veliko časa. Ko je vzorčenje končano, je kot konzervans največkrat uporabljen 1% formaldehid in po končanem konzerviranju, ki ga opravimo tako da na površino vzorca nalijemo konzervans ter nato vzorce zmrzemo in s tem preprečimo izgube snovi katere želimo količinsko določiti.

2.4.2 Kromatografske metode

Med kromatografske metode katere so uporabljene za detekcijo hormonskih motilcev, sta največkrat uporabljeni tekočinska kromatografija (ang. liquid chromatography – LC), plinska kromatografija (ang. gas chromatography – GC) in visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC).

2.4.3 Plinska kromatografija

Pri plinski kromatografiji princip temelji na ločitvi snovi iz mešanice na porazdelitvi mobilno – plinasto fazo in tekočo oz. stacionarno (trdno) fazo, ki je lahko adsorbirana na stene kolone ali pa je adsorbirana na inertne nosilce daknadno vnesene v kolono. Ta tip kromatografije je namenjen ločevanju plinov in visoko hlapnih tekočin, katere se pred neposrednim vstopom v kolono uplinijo v injektorju. Elucija poteka s tokom inertne plinske mobilne faze skozi adsorbirano stacionarno fazo. Ločitev snovi iz mešanice poteka v koloni, medtem ko detekcija v detektorju.

V nasprotju z drugimi vrstami kromatografije tu ne pride do interakcije med mobilno fazo in preučevano snovjo; glavna funkcija mobilne faze pri slednji kromatografiji je transport preučevane spojine skozi kolono (Skoog in West 1980).

2.4.4 Tekočinska kromatografija

Kot pri ostalih kromatografskih metodah se tudi pri tekočinski kromatografiji posamezne komponente v vzorcu ločijo s porazdeljevanjem med dve fazi, stacionarno in mobilno fazo. Mobilna faza pronica skozi stacionarno fazo, katera je nanescena v koloni. Mobilna faza pri tekočinski kromatografiji je tekočina nizke viskoznosti, stacionarna faza pa je iz poroznih mikrodelcev z različno sestavo. Največkrat pa se za stacionarno fazo uporablja silika gel, porozni grafit, porozni organski polimeri,...

2.4.5 Visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLCM)

Pri visokotlačni tekočinski kromatografiji preko kolone s pritiskom okoli 100 atmosfer črpamo mobilno fazo. Kolone so polnjene z različnimi polnili, premer delcev pa je običajno okoli μm . Majhen premer delcev pa je odgovoren, da ima ta tip kromatografije visoko resolucijo. Histrosti analize so velike, saj so zaradi visokega pritiska pretoka mobilne faze v območju ml/min.

2.4.6 Masna spektrometrija

Kot detekcijska metoda za hormonske motilce pa je največkrat uporabljena masna spektrometrija (MS). Metoda nam omogoča določitev strukture molekul, izmerimo njihovo molekulsko maso in opredelitev molekulske formule. Ta metoda je predvsem uporabna za detekcijo hormonskih motilcev, saj je zelo občutljiva analizna metoda katera nam omogoča zaznavo vsebnosti spojine v območju ng do pg.

2.4.7 Imunološke metode

Imunološke metode katere se v večini primerov uporabljajo za kvantifikacijo HM so RIA (ang. radioimmunoassay) in ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), med katerimi je slednja največkrat uporabljena za kvantifikacijo pesticidov in v okolju prisotnih onesnaževal (Meulenbergh s sod. 1995).

Metode delujejo na principu vezave določenega antigena (estrogen) na ustrezna protitelesa beljakovinskega izvora, katera so pritrjena na stene luknjic mikrotiterske plošče. Določeni antigen se veže na označevalec v primeru ELISA testa medtem, ko je pri RIA testu antigen označen z radioizotopom. Protitelesa so proizvedena s strani imunskega sistema kateri sproži proces imenovan imunski odziv ob vdoru škodljivih snovi v organizem. Lahko pa se protitelesa tvorijo iz celične kulture medija. Po zaključku ELISA testa dodamo obarvan substrat za encim vezan na estrogen in kvantificiramo estrogen vezan na protitelesa. Pri RIA testu uporabimo seintilacijski števec s pomočjo katerega izmerimo radioaktivno sevanje estrogena vezanega na protitelesa (Voulvoulis in Scrimshaw 2003).

2.5 Aditivi v živilih

Hiter življenjski tempo in predvsem hitra rast svetovnega prebivalstva spodbuja pridelovalce živil kot tudi samo živilsko industrijo, da uporablja vse več barvil, konzervansov in še veliko drugih umetnih sredstev. Z dodajanjem omenjenih aditivov hrana ostane dlje časa sveža, ima lepši izgled, okus, teksturo ter zadostiti merila po mikrobiološko varni hrani.

Kljub informiranju javnosti ter oznakah in informacijah vsebovanih snovi v proizvodu se nihče popolnoma ne zaveda, da snovi ki jih vsakodnevno posredno zaužijemo s hrano lahko vsebujejo endokrino aktivne snovi, ki lahko motijo delovanje procesov tako v živalskem kot tudi v človeškem telesu.

2.5.1 Propil galat (E 310)

Propil galat je propilni ester 3,4,5-trihidroksibenzojske kisline. Je antioksidant, katerega lastnost je, da zavira antimikrobno aktivnost. Že od leta 1948 se uporablja kot antioksidativno sredstvo v kozmetični, živilski industriji ter v proizvodnji maščob, olja etrov, emulzij in voskov, kjer preprečuje njihovo oksidacijo (Becker 2007).

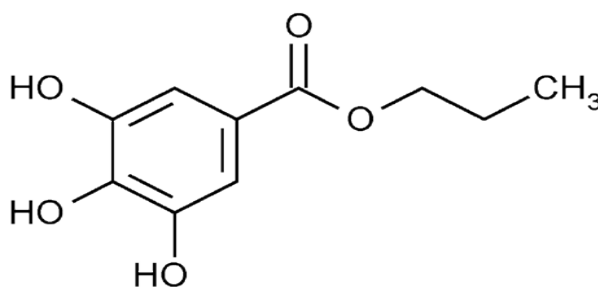
Preglednica 2: Tehnične lastnosti Propil galata.

Molska masa	212.19928 g/mol	
Molekulska formula	$C_{10}H_{12}O_5$	
Topnost pri (25 °C)	Voda 0.35 g/100 ml	Alkohol 103 g /100 g
IUPAC poimenovanje	3,4,5 - trihidroksibenzoat	
Kemijsko poimenovanje	n-propil 3,4,5-trihidrobzenoat	
Struktura/ izgled	bel/ kremasto-bel kristalni prah	

Temperatura tališča	150 °C
----------------------------	--------

2.5.1.1 Proizvodnja Propil galata

Propil galat proizvajajo z esterifikacijo galne kisline s propanoilom pri temperaturi, ki se giblje med 100 in 180 °C. Proizvodnja reakcije je katalizirana s strani močnih kislin (npr. žveplena kislina). Voda, ki je proizvedena med reakcijo pa je odstranjena s pomočjo azeotropne distilacije z nereagiranim alkilnim alkoholom. Po katalizaciji in odstranitvi vode je produkt propil galat izoliran in očiščen s postopkom kristalizacije. Po kristalizaciji se kristali lahko izperejo in rekristalizirajo ter se tako odstranijo ostale nečistoče, ki so še prisotne v produktu. Končni produkt se osuši, preseje in zapakira v za to namenjene embalaže (Rebafka in Nickels 1986; Sas s sod. 2001).



Slika 1: Strukturna formula Propil galata. (Vir: <http://www.pharmacopeia.cn/v29240/images/v29240/g-1161.gif>)

2.5.1.2 Uporaba v živilih

Uporablja se kot antioksidant, ki preprečuje oksidacijo maščob in je dovoljen s strani Evropske unije, katera je določila maksimalne dovoljene količine v živilih, ki se gibljejo med 25 in 1000 mg/kg. Lahko se uporablja sam, vendar se v večini primerov uporablja skupaj z oktil galatom, dodecil galatom, terciarnim butilhidrokinom (TBHQ) in butiliranim hidroksianizolom (BHA). V primeru, da je uporabljen še z slednjimi snovmi je potrebno predhodno določiti proporcijske količine za posamezen aditiv.

V spodnji tabeli so prikazane maksimalne dovoljene količine za nekatera živila, v katerih je uporabljen konzervans E 310 sam ali pa v kombinaciji z zgoraj navedenimi spojinami.

Preglednica 3: Maksimalne dovoljene vrednosti propil galata v nekaterih živilih. (Vir: Regulation (EC) No1333/2008 of the European Parliament and of the Council on food additives. Annex II)

Živilo	Omejitve	Maksimalna dovoljena količina (mg/l ali mg/kg)
Žvečilni gumi	/	400
Žitarice za zajterk	samo predkuhane žitarice	200
Omake	/	200
Prehranski dodatki v tekoči obliki	/	400
Prehranski dodatki v obliki sirupa ali v žvečljivi obliki	/	400
Predelani paradižnikovi proizvodi	samo dehidriran paradižnik	25
Predelani oreščki	/	200
Juhe in raguji	samo dehidrirani proizvodi	200

2.5.1.3 Vpliv na človeka in živali

V klinični raziskavi, pri kateri si je odrasla oseba moškega spola injicirala propil galat v odmerkih 7-10 mg/kg telesne teže 6 zaporednih dni, so po končani raziskavi analizirali njegov urin. Analiza urina ni pokazala nikakeršnih stranskih učinkov propil galata na

ledvice, saj se ni zadržal v telesu ampak se v celoti izločil z urinom (Boehm in Williams 1943).

Znanstveniki iz Romunije so opravili tridnevni poskus na nezrelih podganjih samicah s pomočjo suspenzije snovi, katere se uporabljajo kot antioksidanti in dodatki sestavinam embalaže v kozmetični, prehranski in farmacevtski industriji. Suspenzija je vsebovala butiliran hidroksianizol, butiliran hidrokroksitoluen in propil galat v količinah 300 mg/kg, 75 mg/kg in 405 mg/kg telesne teže osebkov. Vse substance so pokazale zaviralni učinek, vendar je propil galat edini izmed treh preiskovanih snovi povzročil učinke ki so se kazali kot občutno zmanjšanje relativne mase maternice in jajčnikov v primerjavi s kontrolo (Pop s sod. 2013).

2.5.2 Dibutil ftalat (DBP)

Je ftalatni ester z široko uporabo v svetovni industriji (Grant 1986). Je široko uporaben v proizvodnji plastike (PVC), različnih barv, lakov, medicinskih pripomočkov (transfuzij), avtomobilskih varnostnih stekel, pakiranja hrane, kozmetike (laki, parfumska olja) in papirnatih premazov. Njegova uporaba v kozmetiki (laki za lakiranje nohtov) je prepovedana v Evropski uniji po direktivi 76/768/EEC 1976.

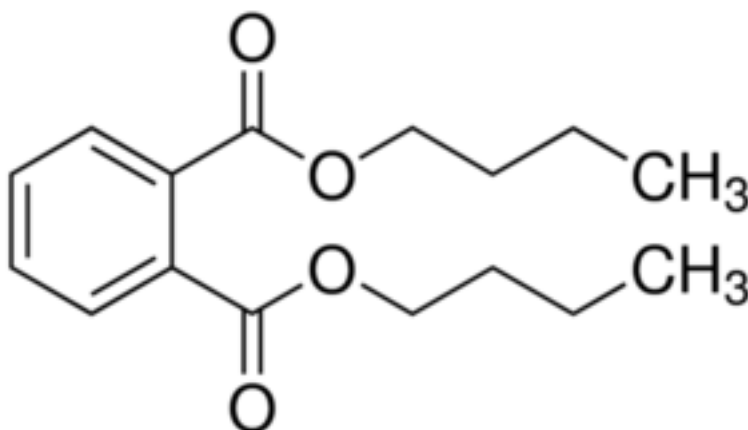
Preglednica 4: Tehnične lastnosti Dibutil ftalata.

Molska masa	278,35 g/mol
Molekulska formula	$C_{16}H_{22}O_4$
Topnost pri (25 °C)	Voda 13 mg/L
IUPAC poimenovanje	Dibutil ftalat
Kemijsko poimenovanje	1,2-benzen-dikarboksilat
Struktura/ izgled	Brezbarvna do rahlo rumena tekočina z aromatičnim

	vonjem
Temperatura tališča	- 35 °C

2.5.2.1 Proizvodnja Dibutil ftalata

Proizvajajo ga z reakcijo med ftalanhidridom in n-butanolom ob prisotnosti žveplove kisline kot katalizatorja. Presežek alkohola nato rekuperirajo in reciklirajo ter di-n-butyl ftalat očistijo s pomočjo vakumske destilacije ali s pomočjo aktivnega oglja.



Slika 2: Strukturna formula Dibutil ftalata. (Vir: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure0/041/mfcd00009441.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00009441-medium.png)

2.5.2.2 Vpliv na človeka in živali

DBP se uporablja kot plastifikator in v živalsko ali človeško telo lahko pride s pomočjo zaužite hrane, ki je bila ovita oz. shranjena v plastični embalaži, ki je vsebovala dibutil ftalat. Po zaužitju omenjene hrane DBP preide v kri in se tako z njeno pomočjo prenese po celotnem telesu organizma (Guess s sod. 1967).

Leta 2005 je bil EFS-in Znanstveni odbor za aditive za živila, arome, pomožna tehnološka sredstva in materiale za stik z živili, zaprosen, da ponovno oceni varnost di-butylftalata (DBP), za uporabo v proizvodnji materialov za stik z živili.

Po pregledu literature je odbor podal mnenje o glavnih kritičnih učinkih in določil dopustni dnevni vnos za ljudi (TDI). Prej, začasni določen dopustni dnevni vnos 0,05 mg / kg telesne teže, je temeljil na podlagi preskusa proliferacije peroksisoma v jetrih glodancev. Novo znanstveno soglasje nakazuje, da preskus proliferacije peroksisoma v jetrih glodancev ni ustrezen za oceno tveganja pri ljudeh, ker se kritični učinki DBP nanašajo na reprodukcijo. Zato so, kot osnovo za določitev TDI uporabili odmerek, pri katerem so se pokazali učinki na razvoj moških in ženskih potomcev podgan, to je LOEL 2 mg/kg telesne teže na dan in uporabili faktor negotovosti 200. Tako je novo postavljen TDI 0,01 mg / kg telesne teže (EFSA 2005).

Izpostavljenost DBP preko hrane je ocenjena le v nekaterih državah. V Veliki Britaniji so v eni izmed takšnih študij ocenili, da skupine živil, kot so meso, jajca perutnina in mleko prispevajo približno 85% vseh zaužitih ftalatov s prehrano in da znaša povprečen vnos DBP preko teh virov 0.2 µg/kg telesne teže /dan za odraslo populacijo.

Primer raziskave migriranja DBP za posamezna živila, kjer so znanstveniki so s pomočjo metode E-screen preučevali različna pakiranja ustekleničenih vod in ugotavljali kakšno estrogensko aktivnost izkazuje voda v različnih steklenicah. Preiskovali so kartonsko, stekleno in PET (plastično) embalažo. Rezultati testa so pokazali, da največjo estrogensko aktivnost vsebuje voda ustekleničena v PET platenkah in sicer najvišja vrednost je bila 5,84 EEQ oz. 1,15 pg DBP na liter ustekleničene vode (Wagner in Oehlmann 2011).

Preglednica 5: Prikaz vrednosti LC₅₀ in LD₅₀, ter poti vstopa za izpostavljene organizme, ter uporabljene koncentracije DBP (Povzeto po (Marsman 1995).

Izpostavljen organizem	Način izpostavljenosti	LC ₅₀ ali LD ₅₀
Podgana	Inhalacija	4,25 g/m ³
Podgana	Oralno	12g/kg
Miš	Inhalacija	25 g/m ³
Miš	Oralno	9 g/kg
Miš	Intravenozno	720 mg/kg

Zajec	Dermalno	> 20 g/kg
Morski prašiček	Oralno	10 g/kg

2.5.3 Metilparaben (E 218)

Je metilni ester p-hidroksibenzojske kisline. Parabeni so uporabljeni v več kot 22.000 kozmetičnih proizvodih (Andersen 2008). Uporablja se tako v kozmetični kot tudi v živilski industriji kot konzervans, ki preprečuje mikrobovno aktivnost. Lahko se uporablja samostojno, v kombinaciji z drugimi parabeni ali v kombinaciji z ostalimi konzervansi, med katerimi izkazuje večje vplive hormonskih motenj (Decker Jr in Wenninger 1987; Soni s sod. 2002).

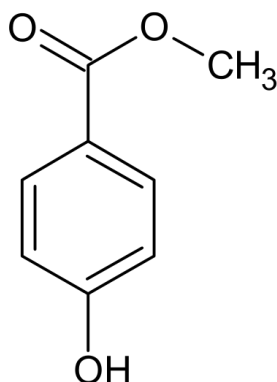
Preglednica 6: Tehnične lastnosti Metilparabena.

Molska masa	152,15 g/mol
Molekulska formula	$C_8H_8O_3$
Topnost pri (25 °C)	2,5 g/L
IUPAC poimenovanje	Metil 4-hidroksibenzoat
Kemijsko poimenovanje	Metil paraben
Struktura/ izgled	Bel kristaličen prah

2.5.3.1 Proizvodnja parabenov

Parabene pridobimo z esterifikacijo p-hidroksibenzojske kisline z ustreznim alkoholom v prisotnosti kisline kot katalizatorja (največkrat je uporabljena žveplena kislina). Kislino

nato nevtraliziramo z natrijevim lugom. Produkt kristaliziramo s pomočjo ohlajanja, centrifugiranja, posušimo z vakuumom, zmeljemo in na koncu še premešamo (Andersen 2008).



Slika 3: Strukturna formula Metil parabena. (Vir: <https://en.wikipedia.org/wiki/Methylparaben#/media/File:Methylparaben.svg>)

Preglednica 7: Uporaba Metil parabena v kozmetičnih izdelkih za leto 1981 in 2006, ter koncentracije E 218 v izdelkih za leto 1981 in 2003 (cit. po (Andersen 2008)).

Izdelek	Uporaba leta 1981	Uporaba leta 2006	Koncentracija leta 1981	Koncentracija leta 2003
Šamponi za lase	364 izdelkov	381 izdelkov	$\leq 0,1 - 1 \%$	0,1 – 0,4 %
Obrazni puder	186 izdelkov	282 izdelkov	$\leq 0,1 - 5 \%$	0,1 – 0,5 %
Otroški losjoni, olja, pudri in kreme	13 izdelkov	33 izdelkov	$\leq 0,1 - 1 \%$	0,2 – 0,4 %
Senčila za oči	883	613	$\leq 0,1 - 5\%$	0,15 – 0,5 %
Rdečilo za ličnice	274	338	$\leq 0,1 - 25 \%$	0,17 – 0,6 %
Preparati za nego telesa in rok	556	631	$\leq 0,1 - 5 \%$	0,15 – 0,4 %
Podlage za ličila	419	189	$\leq 0,1 - 1 \%$	0,1 – 0,3 %

Preglednica 8: Uporabljene in maksimalne dovoljene količine Metil parabena v živilih (Soni s sod. 2002).

Izdelek	Običajno uporabljena količina	Maksimalna dovoljena količina
Mehki bonboni	0,00 ppm	0,001 ppm
Predelana zelenjava	1,00 ppm	1,00 ppm
Pecivo	0,99 ppm	0,99 ppm
Nadomestki sladkorja	0,50 ppm	0,50 ppm
Mesni izdelki	0,00 ppm	0,00 ppm
Brezalkoholne pijače	0,00 ppm	0,01 ppm

Liao s sod. (2013) so analizirali 267 različni živil v ZDA iz skupin pijač, maščob in olj, rib in lupinarjev, žitaric, mesa, sadja in zelenjave. Preiskovali so vsebnost parabenov v omenjenih živilih in rezultati so pokazali da je najvišja vsebnost parabenov v žitaricah in sicer 10 ng/g medtem ko je najnižja vsebnost v maščobah in oljih in sicer 0,8 ng/g.

2.5.3.2 Vpliv na človeka in živali

Metil paraben preide v organizem skozi kožo ali se absorbira v prebavnem traktu. Po absorpciji se v telesu hidrolizira v p-hidroksibenzojsko kislino, katero se konjugira in konjugati se v celoti izločijo iz telesa preko urina. Dosedanje študije metil parabena niso pokazale nikakršnega zadrževanja v izpostavljenih organizmih in nikakršnih kancerogenih lastnosti (Soni s sod. 2002).

2.5.4 Butiliran hidroksianizol (BHA, E 320)

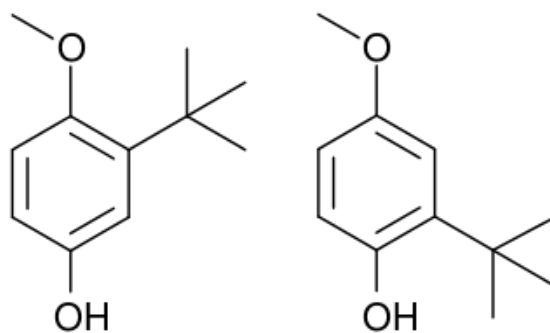
BHA (E 320) je sintetični antioksidant, ki sestoji iz dveh organskih izomerov. Uporablja se kot antioksidant ali kot konzervans v hrani, hrani za živali, kozmetiki, proizvodnji pakiranja hrane in gum, petrolejevih produktih in tudi v medicini, medtem ko uporaba BHA v proizvodnji pijač ni dovoljena (EFSA 2011).

Preglednica 9: Tehnične lastnosti E 320.

Molska masa	180,25 g/mol
Molekulska formula	$C_{11}H_{16}O_2$
Topnost pri (25 °C)	Netopen v vodi
IUPAC poimenovanje	2-tert-butil-4-hidroksianizol in 3-tert-butil-hidroksianizol (mešanica obeh)
Kemijsko poimenovanje	Butiliran hidroksianizol
Struktura/ izgled	Trda voskasta snov

2.5.4.1 Proizvodnja BHA

BHA pripravijo iz 4-metoksifenola in tert-butilnega alkohola pri temperaturi 150 °C ob uporabi silicijevega ali aluminijevega oksida kot katalizatorja. Z metilacijo hidrokinona dobimo intermediat, kateri poda zmes 2-tert-butil-4-hidroksianizola in 3-tert-butil-4-hidroksianizola po obdelavi s tert-butilnim alkoholom in fosforno kislino. Butilacija hidrokinona in kasnejša metilacija z dimetil sulfatom in natrijevim hidroksidom se lahko uporablja tudi za izdelavo zmesi dveh BHA izomerov.



Slika 4: Strukturni formulir BHA izomerov; 2-tert-butil-4-hidroksianizol (levo) in 3-tert-butil-4-hidroksianizol (desno). (Vir: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/65/2-tert-Butyl-4-hydroxyanisole_and_3-tert-butyl-4-hydroxyanisole_2D.svg/320px-2-tert-Butyl-4-hydroxyanisole_and_3-tert-butyl-4-hydroxyanisole_2D.svg.png)

Preglednica 10: Maksimalne dovoljene količine uporabe BHA v živilih v skladu z Direktivo Sveta No 95/2/EC. (EFSA 2011)

Živilo	Maksimalna dovoljena količina (mg/kg)
Ribje olje. Goveje, piščančje in ovčje masti. Masti in olja za cvrtje.	200
Dehidriran paradižnik.	25
Začimbe in dišave.	200
Eterična olja.	1000
Mleko v prahu za prodajne avtomate.	200

2.5.4.2 Vpliv na človeka in živali

Po ocenah naj bi odrasel človek dnevno zaužil do 0,1 mg/kg telesne teže omenjenega antioksidanta BHA. V primeru, da bi človeka izpostavili oz. da bi zaužil količino 50 mg/kg telesne teže dnevno to nebi rezultiralo v nikakršnih poškodbah ali stranskih učinkih. Znanstveniki so v raziskavi z opicami in glodalci katere so zaužile BHA v količinah 500 mg/kg telesne teže opazili patološke, encimske spremembe ter spremembe v lipidih (Branen 1975).

Znanstveniki so v raziskavi analizirali učinke BHA na samooplodne F344 podgane, katerim so v obdobju 2 let v hrano dozirali BHA na ravneh od 0,5 do 2,0 %. Rezultati so pokazali, da antioksidant v večjih odmerkih povzroča povečano pojavnost papiloma in ploščatih celic pri obeh spolih. V obeh primerih tako pri nižjih kot pri višjih odmerkih se je pojavila hiperplazija predželodca. Na koncu so na podlagi tega podali mnenje da je BHA kancerogen v predželodcu F344 podgan (Ito s sod. 1983).

2.6 Onesnaževala v okolju

Hormonski motilci se pojavljajo tudi v okolju, ki nas obdaja. Poti vstopa onesnaževal v okolje so različna. V grobem ločimo dve poti vstopa: točkovne in netočkovne poti vstopa. Pri točkovnih gre za lokacije oz. največkrat za poti, ki jih lažje določimo in so lažje kontrolirane. Med točkovne poti vstopa štejemo iztočne cevi iz tovarn in razbremenilnikov. Pri netočkovnih poteh vnosa pa vstop v okolje ni točkovno določen, ampak se le-ta lahko prenaša s pomočjo izhlapevanja iz tal in nato z dežjem ponovno pade na zemljo. Eden izmed pomembnih netočkovnih poti vstopa je tudi pronicanje skozi plasti tal in posledično vstop v podtalnico s pomočjo katere se nato onesnaževala razširjajo naprej (Birkett 2003).

2.6.1 Poliklorirane spojine

Med poliklorirane spojine uvrščamo industrijsko sintetizirane organske spojine iz skupine cikličnih ogljikovodikov.

Preglednica 11: Prikaz nekaterih polikloriranih spojin, tip testa na določenem organizmu ter učinki na izpostavljen organizem

Tip testa	Organizem	Kategorija	Način izpostavljenosti	Kriterij	Koncentracija	Stranski učinek
Poliklorirani bifenili (PCB)						
In vivo	/	+y	/	/	/	Učinek na spolno reprodukcijo samcev.
Teren	Severnoameriški mink	y	hrana	/	25 µg/dan	Zelo zmanjšan reproduktivni uspeh.
PCB 128 (2,2',3,3',4,4'- Heksaklorobifenil)						
In vivo	Podgana	+ re	hrana	/	/	Relativno zmanjšana raven vitamina A v jetrih.
PCB 136 (2,2',3,3',6,6'- Heksaklorobifenil)						
In vitro	Celice MCF-7	+ e	/	EC 100	10 µM	Spodbujanje proliferacije.

Bromirani in polibromirani difeniletri						
2,2',4,4'-Tetrabromirani difenil eter, BDE-47 (2,2',4,4'-tetraBDE)						
In vivo	Podgana	+ re	oralno	LOEL	2,5 mg/kg telesne teže	Znižane jeterne in pljučne retinoidne ravni.
In vivo	Podgana	+ th	oralno	LOEL	/	Znižanje vrednosti celotne plazme T4.
Oktabromirani difenil eter						
In vivo	Beli zajec	+ y	oralno	/	15 mg/kg	Rahla fetotoksičnost na ravni maternalnih toksičnih odmerkov.
In vivo	Podgana	+ y	/	LOEL	50 mg/kg	Povečano število poznih resorbcij in zmanjšanje teže plodov.

2.6.1.1 Poliklorirani bifenili (PCB)

So med najbolj strupenimi organskimi spojinami, ki jih je ustvaril človek. Včasih so jih na široko uporabljali: v industriji kot sredstva za termoizolacijo, aditivi za plastične mase, dodatki za impregnatorje, aditivi pri pripravi pesticidov in insekticidov, aditivi za barve, lake, kavčuk, tekstil, itd. Leta 1970 so uporabo PCB-jev zaradi njihove strupenosti prepovedali (Lovrenčič 2001).

Znanstveniki so v poskusu hranili podgane s PCB 128, katerega so zmešali s 4 % koruznim oljem in mešanico vsakodnevno dodajali obrokom. Podgane so bile razdeljene v osem skupin in vsaka je vsebovala 10 samcev in 10 samic. Ena izmed osmih skupin je bila kontrolna in predstavnikom te skupine so v hrano dodajali samo 4 % koruzno olje. Po 13 tednih so 10 samčkom in 10 samicam odvzeli jetra ter jih pregledali s pomočjo elektronske mikroskopije. Opazili so abnormalne mitohondrije v jetrih podgan in povečan profil gladkega endoplazmatskega retikuluma (Singh s sod. 2000). V splošnem mešanice PCB-jev povzročajo motnje imunskega, reproduktivnega, živčnega ter endokrinega sistema. Medtem ko visoki odmerki povzročajo raka pri poskusnih živalih, neposrednih dokazov, da povzročajo raka pri ljudeh ni. PCB-ji so torej potencialne mutagene in kancerogene snovi (ATSDR 1998).

2.6.1.2 Bromirani in polibromirani difenil etri

Spadajo v skupino policikličnih aromatskih ogljikovodikov, kateri nastanejo kot produkt pri nepopolnem izgorevanju. Slednje so organobromidne spojine, ki zavirajo vžig in gorenje gorljivih organskih snovi. Večinoma se uporabljajo kot dodatek plastikam (tekstilna industrija, elektro industrija, itd.). Predvsem se uporabljajo v proizvodnji elektronskih izdelkov kot sredstva za zmanjševanje vnetljivosti proizvoda. BDE-47 je med najpogostejše detektiranimi snovmi v okolju in najbolj toksičnimi substancami za organizme (Lu s sod. 2012).

2.6.2 Naravni in sintetični steroidni hormoni

Med naravne steroidne hormone uvrščamo progesteron in testosteron, med katerimi so najznačilnejši predstavniki 17- β -estradiol (E2), estron (E1) in estriol (E3). So vrsta hormonov, ki jih ljudje in živali proizvajamo sami in jih skupaj z urinom in fecesom izločamo v okolje kjer pridejo v stik z drugimi organizmi. Dolga leta so steroidne hormone uporabljali tudi v živinoreji, vendar je bila leta 1989 s strani Evropske unije njihova uporaba prepovedana (Andersson in Skakkebaek 1999).

Sintetični steroidni hormoni se uporabljajo predvsem za oralno kontracepcijo in za hormonske terapije. Leta 1990 je v ZDA 10 milijonov žensk uporabljalo oralno kontracepcijo (Arcand-Hoy s sod. 1998).

2.6.3 Fitoestrogeni

So snovi, ki posedujejo estrogensko aktivnost in so proizvedene s strani rastlin. V človeško ali živalsko telo vstopijo z rastlino, ki jo je žival ali človek zaužil. Ker posedujejo podobno strukturo in lastnosti kot 17 β -etilestradiol delujejo kot hormonski motilci v tarčnem organizmu (Phillips in Harrison 1999).

2.6.4 Fitofarmacevtska sredstva (FFS)

Največji delež svetovne uporabe pesticidov se uporabi za namene kmetijstva, pravtako pa se uporabljajo v težki industriji kot aditivi za hladilne tekočine pri strojni obdelavi kovin (Wright in Welbourn 2002). Glifosat je svetovno eden najbolj uporabljenih pesticidov predvsem na poljih soje in koruze, kjer zavira rast velikega števila plevelov. Poseduje zelo nizko toksičnost v živalih in US EPA ga je uvrstila v skupino E kamor sodijo snovi, ki niso kancerogene za človeka (Facts 1993). Klordimeform je akaracid, ki se uporablja predvsem za zatiranje klopov in pršic. Njegova lastnost je tudi, da zmanjšuje uspešnost izleganja pri nekaterih vrstah metuljev (Matsumura in Beeman 1976). Alaklor in dibromoetan oba posedujeta lastnosti herbicidov, vendar je dibromoetan tudi močan insekticid predvsem za zatiranje žuželk.

Preglednica 12: Prikaz nekaterih pesticidov, tip testa na določenem organizmu ter učinki na izpostavljen organizem (Commission).

Tip testa	Organizem	Kategorija	Način izpostavljenosti	Kriterij	Koncentracija	Stranski učinek
Glifosat						
In vivo	Salmo gairdneri	- y	/	NOEC	24 mg/L	Spremembe v obnašanju.
Klordimeform						
In vivo	Miš	+ e	oralno	LOEL	148 mg/kg telesne teže	Zavlačevanje vala luteinizirajočega hormona in sprememba v časovnem razporedu oksitocitnega sproščanja.
Klorfentenzin						
In vivo	Glodalec	+ th	/	/	/	Tumorji; povečane vrednosti tirotropnega hormona.

Dibromoetan						
In vivo	Teleta; Izraelsko-frizijski bik	+ e	oralno	LOEL	2 mg/kg telesne teže	Zmanjšana gostota in gibljivost sperme.
Alaklor						
In vivo	Samci podgan	+ th	hrana; tednov	12 ED	126 mg/kg telesne teže	Rahla fetotoksičnost na ravni maternalnih toksičnih odmerkov.

2.6.5 Organske kisikove spojine

Med organske kisikove spojine prištevamo bisfenole in ostale snovi, ki se dodajajo plastiki ter dioksine ki so npr. prisotni v smolah, belilih. Bisfenol A (BPA) se proizvaja v velikih količinah in kar 90 % je porabljenega v industriji plastike za produkcijo polikarbonatnih in epoksi smol ter zaviralcev gorenja (Fromme s sod. 2002). Med ftalati je v največjih količinah uporabljen DEHP. Med letoma 1994/1995 je bilo v Nemčiji proizvedenega 250.000 ton DEHP (Fromme s sod. 2002). Dioksini se komercialno ne proizvajajo, ampak nastajajo kot stranski produkt pri nekaterih industrijskih procesih in procesih izgorevanja (Vallack s sod. 1998).

Preglednica 13: Prikaz nekaterih pesticidov, tip testa na določenem organizmu ter učinki na izpostavljen organizem.

Tip testa	Organizem	Kategorija	Način izpostavljenosti	Kriterij	Koncentracija	Stranski učinek
Dioksini						
2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-p-dioksin						
In vivo	Piščanec	+ y	/	LD ₅₀	0,24 µg/kg teže jajca	Preživetje embrijev.
Bisfenoli						
Tetrabromobisfenol A (TBBP-A)						
Dibromoetan						
In vivo	Podgana	- y	hrana	NOEL	50 mg/kg	Pridobile na masi, spremenjeno obnašanje, večja umrljivost.

Ftalati						
In vivo	Breja podgana	+ e	oralno	/	1 mg/L	Zmanjšana velikost testisov.
Di-(2-etilheksil) ftalat (DEHP)						
In vivo	Deva	+ y	/	LOEL	600 mg/kg	Zmanjšana uspešnost ulova.

2.6.6 Površinsko aktivne snovi (Surfaktanti)

V skupino surfaktantov spadajo snovi, katere se pretežno uporablja v proizvodnji detergentov. Med glavne predstavnike skupine surfaktantov, ki lahko delujejo kot hormonski motilci uvrščamo alkilfenole, njihove etoksilate in nonilfenole. (Birkett 2003)

Preglednica 14: Prikaz nekaterih surfaktantov, tip testa na določenem organizmu ter učinki na izpostavljen organizem.

Tip testa	Organizem	Kategorija	Način izpostavljenosti	Kriterij	Koncentracija	Stranski učinek
Alkilfenoli in njihovi derivati						
4-tert-Butilfenol						
In vitro	MCF-7 celice	+ e	/	LOEL	10 µM	Stimulacija proliferacije celic.
4-tert-Oktilfenol						
In vivo	Podganja samica	+ e	oralno	LOEL	100 mg/kg telesne teže/dnevno	Pospešeno vaginalno odpiranje.

4-Nonilfenoldietoksilat (NP2 EO)						
In vitro	Šarenka	+ e	/	/	30 µg/L	Zvišanje vitelogenina v plazmi.
4-Nonilfenolnonaetoksilat (Tergitol NP 9)						
In vitro	Potočna postrv	+ e	/	EC ₅₀	82,31 µM	Povečana sinteza vitelogenina.

2.7 Učinki njihove uporabe na človeka in okolje

S povečanjem obsega kemične, tekstilne, prehranske, kozmetične in farmacevtske industrije je prišlo tudi do porasta bolezni in motenj endokrinega sistema. Med vsemi motnjami, ki jih povzročajo hormonski motilci so najbolj pereče reproduktivne in razvojne motnje (EEA 2012).

Endokrini sistem poleg imunskega in živčnega predstavlja pomemben regulatni sistem v človeškem in živalskem telesu. S tega stališča lahko predpostavimo, da je izpostavljenost onesnaževalom, ki izkazujejo hormonsko aktivnost velik svetovni problem.

Veliko število raziskav na temo HM je pokazalo, da kar nekaj snovi prisotnih v okolju moti delovanje reproduktivnega sistema tako samic kot tudi samcev. Pri samicah se učinki HM kažejo predvsem v neplodnosti, nenormalni spolni diferenciaciji, rasti foliklov na jajčnikih. Pri samcih pa je najopaznejši znak pri izpostavljenosti količina producirane sperme in anomalije reproduktivnega trakta (npr. zelo zmanjšan penis) (Crisp s sod. 1998).

Pri ljudeh so škodljivi učinki hormonskih motilcev, kateri so najbolj pogosti: pri moških je najbolj pogost pojav izpostavljenosti HM zmanjšana produkcija sperme in zmanjšana reproduktivna sposobnost, medtem ko je pri ženskah zmanjšana reprodukcijska sposobnost in povečana možnost za nastanek raka dojk (Safe 2000).

3 ZAKLJUČEK

Hormonski motilci s svojo prisotnostjo v okolju, odpadnih vodah, hrani in pijači povzročajo za mnoge resne stranske učinke tudi v zelo nizkih koncentracijah. Njihova prisotnost se z leti povečuje, saj hitro rastoče prebivalstvo »sili« pridelovalce in industrijo v uporabo sredstev (konzervansi, sladila, arome, detergenti, repelenti, fitofarmacevtska sredstva, zaviralci gorenja, itd.), ki lahko v določenih količinah povzročijo nezaželene škodljive učinke v tarčnem organizmu in/ ali tkivu.

Hormonske motilce delimo v 6 skupin in sicer: naravni in sintetični steroidni hormoni, fitoestrogeni, fitofarmacevtska sredstva, organske kisikove spojine, površinsko aktivne snovi in aditivi. Po našem mnenju med najbolj problematično skupino hormonskih motilcev spadajo fitofarmacevtska sredstva, saj se le ti široko uporabljajo v kmetijstvu in se lahko prenašajo z vetrom, podtalnico, in tudi organizmi, ki zaužijejo tretirano sadje ali zelenjavo.

Veliko je bilo že napisanega in narejenega na temo prisotnosti onesnaževal s hormonsko aktivnostjo v okolju, vendar še vedno obstajajo nezapolnjene vrzeli tako v znanju o njihovih vplivih, zakonodaji ki ureja to področje, industriji, arhitekturi, pravu, itd., ki bi nam pomagale zmanjšati vnos tovrstnih onesnaževal v okolje.

Testi za identifikacijo in karakterizacijo hormonskih motilcev so ključnega pomena, saj nam omogočijo identifikacijo spojin v različnih vzorcih in posledično prikaz njihovih škodljivih učinkov na izpostavljene organizme. Težava kvantifikacije in prav tako identifikacije tovrstnih snovi je, da nastopajo v zelo nizkih koncentracijah v okoljskih vzorcih, ki bi lahko imele vpliv na okolje in zdravje. Bistvo pri hormonskih motilcih je, da lahko delujejo/učinkujejo že pri zelo nizkih koncentracijah v okolju, ni pa nujno, da so v takih koncentracijah škodljive bodisi za okolje bodisi za zdravje. V ta namen je potrebno tovrstne metode dopolnjevati, izboljševati ali predpisati nove, ki nam bodo v pomoč pri identifikaciji in posledično morebitnemu zmanjšanju vnosov v okolje. Prav tako je

potrebno pri metodah »in vitro« in »in vivo« preveriti razpoložljive teste, jih izboljšati in ustvariti nove, kateri bodo imeli nižjo detekcijo in bodo posledično sposobni določiti več škodljivih snovi prisotnih v okolju in živilih.

S testi si pomagamo, da kemikalije identificiramo in kvantificiramo, vendar je ključnega pomena pri zmanjševanju vnosov kemikalij v okolje in zmanjševanje njihove uporabe človeško udejstvovanje na tem področju. V ta namen bi bilo potrebno organizirati čim več sestankov in dogodkov za informiranje javnosti na tem področju, kajti le na tak način bi se lahko njihova uporaba zmanjšala in predvsem človeško zavedanje izboljšalo. Prav tako bi se morali v prihodnosti vsi pridelovalci in predvsem farmacevtska, živilska, kemična in kozmetična industrija posvetiti zmanjševanju uporabe snovi s hormonsko aktivnostjo v svojih produktih.

Najpomembnejši cilj prihodnosti na področju je analiziranje kombiniranih vplivov hormonskih motilcev. Na tematico je zelo malo napisanega in tudi opravljenih je bilo malo raziskav. Kar nekaj kemikalij je katere same ne izkazujejo hormonske aktivnosti, lahko pa jo sprožijo v mešanici z določenimi drugimi spojinami. Potrebno bi bilo opraviti čim večje število testov v katerih bi kombinirali različna onesnaževala in opazovali njihovo sinergijo in skupni vpliv na hormonski sistem ljudi in živali.

V prihodnje bi bilo potrebno tudi zmanjšati število metod, ki temeljijo na vključevanju živali, saj je vsako dejanje, ki škoduje živali nehumano in neprimerno. V ta namen bi živali v metodah lahko npr. zamenjali s kvasovkami.

4 LITERATURA

- Adeeko, A., Li, D., Forsyth, D. S., Casey, V., Cooke, G. M., Barthelemy, J., . . . Hales, B. F. (2003). Effects of in utero tributyltin chloride exposure in the rat on pregnancy outcome. *Toxicological Sciences*, 74(2), 407-415.
- Alda, M. J., & Barceló, D. (2001). Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 371(4), 437-447.
- Andersen. (2000). *Zebrafish for testing endocrine disrupting chemicals*: Nordic Council of Ministers.
- Andersen. (2008). Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products. *International journal of toxicology*, 27, 1-82.
- Andersson, A.-M., & Skakkebaek, N. E. (1999). Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. *European Journal of Endocrinology*, 140(6), 477-485.
- Andrade, A. J., Grande, S. W., Talsness, C. E., Gericke, C., Grote, K., Golombiewski, A., . . . Chahoud, I. (2006). A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult male offspring rats. *Toxicology*, 228(1), 85-97.
- Arcand-Hoy, L., Nimrod, A., & Benson, W. (1998). Endocrine-modulating substances in the environment: estrogenic effects of pharmaceutical products. *International journal of toxicology*, 17(2), 139-158.

- Arnold, S. F., Klotz, D. M., Collins, B. M., Vonier, P. M., Guillette, L. J., & McLachlan, J. A. (1996). Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science*, 272(5267), 1489-1492.
- ATSDR. (1998). *Draft Toxicological Profile for Polychlorinated Biphenyls (PCBs)*: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Barlow. (2001). Environmental effects on reproductive health: Introduction. *Human Reproduction*, 16, 971-971. doi: 10.1093/humrep/16.5.971
- Barlow, S., Schlatter, J., Öberg, T., Castoldi, A., Cutting, A., Jacobs, M., . . . Mohimont, L. (2010). Scientific report of the endocrine active substances task force. *EFSA Journal*, 8(11), Article ID: 1932.
- Becker, L. (2007). Final report on the amended safety assessment of propyl gallate. *International journal of toxicology*, 26, 89-118.
- Beresford, N., Routledge, E., Harris, C., & Sumpter, J. (2000). Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 162(1), 22-33.
- State of the science of endocrine disrupting chemicals, 2012, 211 S3 (2012).
- Bhagavan, N., & Ha, C.-E. (2015). *Essentials of Medical Biochemistry: With Clinical Cases*: Academic Press.
- Birkett, J. (2003). Sources of endocrine disrupters. *Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes*, 35-58.
- Boehm, E., & Williams, R. (1943). A study of the inhibiting actions of propyl gallate (normal propyl trihydroxy benzoate) and certain other trihydric phenols on the autoxidation of animal and vegetable oils. *Quart. J. Pharm. Pharmacol*, 16, 232-243.

- Branen, A. (1975). Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 52(2), 59-63.
- Casals-Casas, C., & Desvergne, B. (2011). Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annual review of physiology*, 73, 135-162.
- Chang, H.-S., Choo, K.-H., Lee, B., & Choi, S.-J. (2009). The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *J Hazard Mater*, 172(1), 1-12.
- Colborn, T., vom Saal, F. S., & Soto, A. M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect*, 101(5), 378-384.
- Commission, E. Annex 8 Human health and wildlife relevant data on endocrine disruption included in the database on the remaining substances.
- Committee, I. A., & Testing, R. (2012). Information on OECD Work Related to Endocrine Disrupters. *Appraisal*, 1-8.
- Cook, J. C., Mullin, L. S., Frame, S. R., & Biegel, L. B. (1993). Investigation of a Mechanism for Leydig Cell Tumorigenesis by Linuron in Rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 119(2), 195-204. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/taap.1993.1060>
- Cowin, P. A., Gold, E., Aleksova, J., O'Bryan, M. K., Foster, P. M., Scott, H. S., & Risbridger, G. P. (2010). Vinclozolin exposure in utero induces postpubertal prostatitis and reduces sperm production via a reversible hormone-regulated mechanism. *Endocrinology*, 151(2), 783-792.

- Crisp, Clegg, Cooper, R., Wood, W., Anderson, D., Baetcke, K., . . . Schaeffer, J. (1998). Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environ Health Perspect*, 106(Suppl 1), 11.
- Damstra, T., Barlow, S., Bergman, A., Kavlock, R., & Van Der Kraak, G. (2002). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. *Geneva: World Health Organization*.
- de Mes, T. (2007). *Fate of estrogens in biological treatment of concentrated black water*: Wageningen Universiteit.
- De Mes, T., Zeeman, G., & Lettinga, G. (2005). Occurrence and fate of estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol in STPs for domestic wastewater. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 4(4), 275-311.
- Decker Jr, R., & Wenninger, J. (1987). Frequency of preservative use in cosmetic formulas as disclosed to FDA-1987. *Cosmetics and toiletries*, 102(12), 21-24.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., . . . Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*, 30(4), 293-342.
- Dorfman, & Dorfman, A. (1954). Estrogen assays using the rat uterus 1. *Endocrinology*, 55(1), 65-69.
- Dybing, E., Doe, J., Groten, J., Kleiner, J., O'Brien, J., Renwick, A., . . . Walker, R. (2002). Hazard characterisation of chemicals in food and diet: dose response, mechanisms and extrapolation issues. *Food and Chemical Toxicology*, 40(2), 237-282.
- EEA, E. E. A. (2012). The impacts of endocrine disrupters on wildlife, people and their environments – The Weybridge+15 (1996–2011) report *EEA Technical report*, 2/2012, 116. doi: doi:10.2800/41462 ISSN 1725-2237 ISBN 978-92-9213-307-8

- EFSA. (2005). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Material in Contact with Food (AFC) on a request from the Commission related to Di-Butylphthalate (DBP) for use in food contact materials. Question N° EFSA-Q-2003-192. *EFSA Journal*, 17.
- EFSA. (2011). Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxyanisole – BHA. *EFSA Journal*, 9, 2392. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2392.
- EFSA. (2013). Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment. *EFSA J*, 11(3132), 84.
- Elzeinova, F., Novakova, V., Buckiova, D., Kubatova, A., & Peknicova, J. (2008). Effect of low dose of vinclozolin on reproductive tract development and sperm parameters in CD1 outbred mice. *Reproductive Toxicology*, 26(3), 231-238.
- Facts, R. (1993). Glyphosate. *Washington DC: United States Environmental Protection Agency*, 1-7.
- Faqi, A., Dalsenter, P., Merker, H., & Chahoud, I. (1998). Effects on developmental landmarks and reproductive capability of 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl and 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl in offspring of rats exposed during pregnancy. *Human & experimental toxicology*, 17(7), 365-372.
- Fisher, J. S., Turner, K. J., Brown, D., & Sharpe, R. M. (1999). Effect of neonatal exposure to estrogenic compounds on development of the excurrent ducts of the rat testis through puberty to adulthood. *Environ Health Perspect*, 107(5), 397.
- Foote, R. H. (1999). Cadmium affects testes and semen of rabbits exposed before and after puberty. *Reproductive Toxicology*, 13(4), 269-277.

- Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Müller, J., & Wenzel, A. (2002). Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water research*, 36(6), 1429-1438.
- Grant, W. M. (1986). *Toxicology of the eye: effects on the eyes and visual system from chemicals, drugs, metals and mineral, plants, toxins and venoms: also, systemic side effects from eye medications* (Vol. 1): Charles C. Thomas Publisher.
- Gray, L., & Ostby, J. S. (1995). In utero 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 133(2), 285-294.
- Gray, L., Ostby, J. S., & Kelce, W. R. (1994). Developmental effects of an environmental antiandrogen: the fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 129(1), 46-52.
- Guess, W., Jacob, J., & Autian, J. (1967). A study of polyvinyl chloride blood bag assemblies. I. *Alteration or contamination of ACD solutions. Drug Intell*, 1, 120-127.
- Guillette, L. J., Gross, T. S., Masson, G. R., Matter, J. M., Percival, H. F., & Woodward, A. R. (1994). Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect*, 102(8), 680.
- Hershberger, L., Shipley, E. G., & Meyer, R. K. (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Experimental Biology and Medicine*, 83(1), 175-180.
- Howell, W. M., Black, D. A., Bortone, S. a., Copeia, S., Dec, N., & Black, D. a. N. N. (2014). Abnormal Expression of Secondary Sex Characters in a Population of Mosquitofish , *Gambusia affinis holbrooki* : Evidence for Environmentally-Induced

Masculinization Abnormal Expression of Secondary Sex Characters in a Population of Mosquitofish , *Gambusia* 1980, 676-681.

IEH assessment on environmental oestrogens : consequences to human. (1995).

Ishitobi, H., & Watanabe, C. (2005). Effects of low-dose perinatal cadmium exposure on tissue zinc and copper concentrations in neonatal mice and on the reproductive development of female offspring. *Toxicology letters*, 159(1), 38-46.

Ito, N., Fukushima, S., Haqlwara, A., Shibata, M., & Ogiso, T. (1983). Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 70(2), 343-352.

Jason, W. B. (2002). Scope of the Problem *Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes*: CRC Press.

Johnson, M. D., Kenney, N., Stoica, A., Hilakivi-Clarke, L., Singh, B., Chepko, G., . . . Foss, C. (2003). Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nature medicine*, 9(8), 1081-1084.

Katsuda, S.-i., Yoshida, M., Watanabe, G., Taya, K., & Maekawa, A. (2000). Irreversible effects of neonatal exposure to p-tert-octylphenol on the reproductive tract in female rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 165(3), 217-226.

Keith, L. H., Jones-Lepp, T. L., & Needham, L. L. (2000). *Analysis of environmental endocrine disruptors*: Amer Chemical Society.

Kelce, W. R., Stone, C. R., Laws, S. C., Gray, L. E., Kemppainen, J. A., & Wilson, E. M. (1995). Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*, 375, 581-585. doi: 10.1097/00006254-199602000-00020

Kishta, O., Adeeko, A., Li, D., Luu, T., Brawer, J. R., Morales, C., . . . Barthelemy, J. (2007). In utero exposure to tributyltin chloride differentially alters male and

female fetal gonad morphology and gene expression profiles in the Sprague–Dawley rat. *Reproductive Toxicology*, 23(1), 1-11.

Kortenkamp, A. (2007). Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals.

Kortenkamp, A., Martin, O., Faust, M., Evans, R., McKinlay, R., Orton, F., & Rosivatz, E. (2011). State of the art assessment of endocrine disrupters. *Final Report.[Online]* Available at: http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/4_SOTA%20EDC%20Final%20Report, 20, V3.

Kuriyama, S. N., & Chahoud, I. (2004). In utero exposure to low-dose 2, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB 118) impairs male fertility and alters neurobehavior in rat offspring. *Toxicology*, 202(3), 185-197.

Lee, B., Pine, M., Johnson, L., Rettori, V., Hiney, J. K., & Les Dees, W. (2006). Manganese acts centrally to activate reproductive hormone secretion and pubertal development in male rats. *Reproductive Toxicology*, 22(4), 580-585.

Legler, J. (2002). Determination of the estrogenic potency of phyto-and synthetic estrogens using in vitro bioassays. *Natural and Synthetic Estrogens: Aspects of the Cellular and Molecular Activity*. G. Alink. Trivandrum, India, Transworld Research Network, 1-11.

Lewis, R. W., Brooks, N., Milburn, G. M., Soames, A., Stone, S., Hall, M., & Ashby, J. (2003). The effects of the phytoestrogen genistein on the postnatal development of the rat. *Toxicological Sciences*, 71(1), 74-83.

Liao, C., Liu, F., & Kannan, K. (2013). Occurrence of and dietary exposure to parabens in foodstuffs from the United States. *Environ Sci Technol*, 47(8), 3918-3925.

- Lintelmann, J., Katayama, a., Kurihara, N., Shore, L., & Wenzel, a. (2003). Endocrine disruptors in the environment. *Pure and Applied Chemistry*, 75, 631-681. doi: 10.1351/pac200375050631
- Lovrenčič, V. (2001). *Tehnična pojasnila k Pravilniku o odstranjevanju polikloriranih bifenilov (PCB) in polikloriranih terfenilov (PCT) (Ur. l. RS, št. 15/00)*: Ministrstvo za okolje in prostor, Uprava Republike Slovenije za varstvo narave.
- Lu, X., Chen, C., Zhang, S., Ou, Y., Yin, L., & Wu, W. (2012). [Microbial degradation of 2, 2', 4, 4'-tetrabrominated diphenyl ether under anaerobic condition]. *Huan jing ke xue*= *Huanjing kexue*/[bian ji, Zhongguo ke xue yuan huan jing ke xue wei yuan hui" *Huan jing ke xue*" bian ji wei yuan hui.], 33(3), 1000-1007.
- Mably, T. A., Bjerke, D. L., Moore, R. W., Gendron-Fitzpatrick, A., & Peterson, R. E. (1992). In utero and lactational exposure of male rats to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 114(1), 118-126.
- Marsman, D. (1995). NTP technical report on the toxicity studies of Dibutyl Phthalate (CAS No. 84-74-2) Administered in Feed to F344/N Rats and B6C3F1 Mice. *Toxicity report series*, 30, 1-G5.
- Martin, L., & Claringbold, P. (1960). The mitogenic action of oestrogens in the vaginal epithelium of the ovariectomized mouse. *Journal of Endocrinology*, 20(3), 173-NP.
- Matsumura, F., & Beeman, R. W. (1976). Biochemical and physiological effects of chlordimeform. *Environ Health Perspect*, 14, 71-82.
- McGivern, R. F., Sokol, R. Z., & Berman, N. G. (1991). Prenatal lead exposure in the rat during the third week of gestation: long-term behavioral, physiological, and anatomical effects associated with reproduction. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 110(2), 206-215.

- McLachlan, J. (1977). Prenatal exposure to diethylstilbestrol in mice: toxicological studies. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 2(3), 527-537.
- Melmed, S., Polonsky, K. S., Larsen, P. R., & Kronenberg, H. M. (2011). *Williams textbook of endocrinology*: Elsevier Health Sciences.
- Meulenberg, E. P., Mulder, W. H., & Stoks, P. G. (1995). Immunoassays for pesticides. *Environ Sci Technol*, 29(3), 553-561.
- Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usumi, K., & Ono, H. (2001). Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reproductive Toxicology*, 15(4), 399-411.
- O'Connor, J. C., Frame, S. R., Biegel, L. B., Cook, J. C., & Davis, L. G. (1998). Sensitivity of a Tier I screening battery compared to an in utero exposure for detecting the estrogen receptor agonist 17 β -estradiol. *Toxicological Sciences*, 44(2), 169-184.
- OECD. (2012). Series on Testing and Assessment: No 150: Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption., 524p.
- Pan, L., Xia, X., Feng, Y., Jiang, C., Cui, Y., & Huang, Y. (2008). Exposure of Juvenile Rats to the Phytoestrogen Daidzein Impairs Erectile Function in a Dose- Related Manner in Adulthood. *Journal of andrology*, 29(1), 55-62.
- Petersen, G., Andersen, L., Holbech, H., & Pedersen, K. (2000). Baseline test studies and development of ELISA. Eds. Andersen, L., Bengtsson, BE, Björk, M, Gessbo, A, Holbech, H., Hylland, K., Norrgren, L., Pedersen, KL, Lundgren, A., Petersen, GI, Steinholz, A., and Örn, S., *TemaNord*, 555, 35-46.
- Phillips, B., & Harrison, P. (1999). Overview of the endocrine disrupters issue. *Issues in environmental science and technology*, 12, 1-26.

- Pine, M., Lee, B., Dearth, R., Hiney, J. K., & Les Dees, W. (2005). Manganese acts centrally to stimulate luteinizing hormone secretion: a potential influence on female pubertal development. *Toxicological Sciences*, 85(2), 880-885.
- Pocock, V. J., Sales, G. D., Wilson, C. A., & Milligan, S. R. (2002). Effects of perinatal octylphenol on ultrasound vocalization, behavior and reproductive physiology in rats. *Physiology & behavior*, 76(4), 645-653.
- Pop, A., Berce, C., Bolfa, P., Nagy, A., Catoi, C., Dumitrescu, I. B., . . . Loghin, F. (2013). Evaluation of the possible endocrine disruptive effect of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and propyl gallate in immature female rats. *Farmacia*, 61, 202-211.
- Rebafka, W., & Nickels, H. (1986). Preparation of alkyl gallates: Google Patents.
- Ronis, M. J., Badger, T. M., Shema, S. J., Roberson, P. K., & Shaikh, F. (1996). Reproductive toxicity and growth effects in rats exposed to lead at different periods during development. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 136(2), 361-371.
- Routledge, E. J., & Sumpter, J. P. (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 241-248. doi: 10.1002/etc.5620150303
- Safe, S. H. (2000). Endocrine disruptors and human health--is there a problem? An update. *Environ Health Perspect*, 108(6), 487.
- Sas, B., Coppens, B., & Van hemel, J. (2001). Method of crystallizing and purifying alkyl gallates: Google Patents.
- Shelby, M. D., Newbold, R. R., Tully, D. B., Chae, K., & Davis, V. L. (1996). Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays. *Environ Health Perspect*, 104(12), 1296.

- Singh, A., Connell, B., & Chu, I. (2000). PCB 128-induced ultrastructural lesions in the rat liver. *Journal of submicroscopic cytology and pathology*, 32(1), 145-152.
- Skoog, D. A., & West, D. M. (1980). *Principles of instrumental analysis* (Vol. 158): Saunders College Philadelphia.
- Soni, M., Taylor, S., Greenberg, N., & Burdock, G. (2002). Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology*, 40(10), 1335-1373.
- Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N., & Serrano, F. O. (1995). The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect*, 103(Suppl 7), 113.
- Sumpter, J. P. (2008). The ecotoxicology of hormonally active micropollutants. *Water Sci Technol*, 57, 125-130. doi: 10.2166/wst.2008.796
- Toman, R., Massányi, P., & Uhrin, V. (2002). Changes in the testis and epididymis of rabbits after an intraperitoneal and peroral administration of cadmium. *Trace elements and electrolytes*, 19(3), 114-117.
- Vallack, H. W., Bakker, D. J., Brandt, I., Broström-Lundén, E., Brouwer, A., Bull, K. R., . . . Jansson, B. (1998). Controlling persistent organic pollutants—what next? *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 6(3), 143-175.
- Voulvoulis, N., & Scrimshaw, M. (2003). Methods for the determination of endocrine disruptors. *Endocrine disruptors in wastewater and sludge treatment processes*, 59-101.
- Wagner, M., & Oehlmann, J. (2011). Endocrine disruptors in bottled mineral water: Estrogenic activity in the E-Screen. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(1–2), 128-135. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.10.007>

- Wharfe, J. (2004). Hazardous chemicals in complex mixtures—a role for direct toxicity assessment. *Ecotoxicology*, 13(5), 413-421.
- WHO. (2012). Possible developmental early effects of endocrine disrupters on child health. 1-84.
- Wolf, C. J., Lambright, C., Mann, P., Price, M., Cooper, R. L., Ostby, J., & Gray, L. E. J. (1999). Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicology and industrial health*, 15, 94-118.
- Wright, D. A., & Welbourn, P. (2002). *Environmental toxicology* (Vol. 11): Cambridge University Press.
- Yamamoto, M., Shirai, M., Sugita, K., Nagai, N., Miura, Y., Mogi, R., . . . Arishima, K. (2003). Effects of maternal exposure to diethylstilbestrol on the development of the reproductive system and thyroid function in male and female rat offspring. *The Journal of toxicological sciences*, 28(5), 385-394.
- Ying, G.-G., Kookana, R. S., & Ru, Y.-J. (2002). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment international*, 28(6), 545-551.
- You, L., Casanova, M., Archibeque-Engle, S., Sar, M., Fan, L.-Q., & Heck, H. d. A. (1998). Impaired male sexual development in perinatal Sprague-Dawley and Long-Evans hooded rats exposed in utero and lactationally to p, p'-DDE. *Toxicological Sciences*, 45(2), 162-173.
- Zacharewski, T. (1997). In vitro bioassays for assessing estrogenic substances. *Environ Sci Technol*, 31(3), 613-623.

PRILOGE

Priloga A : Tabela z oznakami in njihovimi razlagami za preglednice v poglavju Onesnaževala v okolju.

Kategorija	e – predvideni estrogenski učinki
	re – retinoidni učinki
	th – učinek na ščitnični organ
	y – učinki na reprodukcijo
	z – drugi učinki
	» - « nobenih učinkov v vseh testnih koncentracijah
	» + « se nanaša na ugotovitev, da so bili učinki ugotovljeni v poskusu
Kriterij	NOEL – raven brez opaženega učinka
	LOEL – najnižja raven izpostavljenosti z opaženim učinkom

Kriterij	LC ₅₀ – letalna koncentracija pri kateri umre 50 % populacije
	LD ₅₀ – letalna doza pri kateri umre 50 % populacije
	EC ₅₀ – polovična maksimalna učinkujoča koncentracija
	EC ₁₀₀ – celotna maksimalna učinkujoča koncentracija
	ED – dozni efekt
	NOEC – koncentracija brez opaženega učinka
	LOEC – najnižja koncentracija z opaženim učinkom